

THÈSE

PRÉSENTÉE

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD
DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

PAR

Moustapha KARAHJOLI

Licencié ès - sciences de l'Université de Damas

ETUDE DE LA PAROI DES NOCARDIA Peptidoglycane et Fraction polypeptidique de *NOCARDIA CAVIAE*.

Soutenue le 21 Juillet 1972 devant la Commission d'Examen :

M. J. CHOPIN	<i>Président</i>
M ^{elle} A.-M. GOUNOT	} <i>Examineurs</i>
M. G. MICHEL	

LYON
1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552613_0013

THÈSE

PRÉSENTÉE

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD
DE LYON

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

PAR

Moustapha KARAHJOLI

Licencié ès - sciences de l'Université de Damas

ETUDE DE LA PAROI DES NOCARDIA Peptidoglycane et Fraction polypeptidique de *NOCARDIA CAVIAE*.

Soutenue le 21 Juillet 1972 devant la Commission d'Examen :

M. J. CHOPIN	<i>Président</i>
M ^{lle} A.-M. GOUNOT	} <i>Examineurs</i>
M. G. MICHEL	

LYON

1972

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN

1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. médicale Grange-Blanche

M. le Professeur D. GERMAIN

U.E.R. médicale Alexis Carrel

M. le Professeur C. GIROD

U.E.R. médicale LYON-Nord

M. le Professeur A. BERTOYE

U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest

M. le Professeur L. TOLOT

U.E.R. des Sciences pharmaceutiques

M. M. CARRAZ, Maître de Conférences
agrégé

U.E.R. des Techniques de Réadaptation

M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN

U.E.R. de Biologie humaine

M. J. C. CZYBA, Maître de Conférences
agrégé

U.E.R. d'Education Physique et Sportive

M. A. MILLON, Professeur E. P. S.

U.E.R. des Sciences Odontologiques

M. R. VINCENT

U.E.R. de Mathématiques

M. le Doyen J. BRACONNIER

U.E.R. de Physique

M. le Professeur M. DUFAY

U.E.R. de Chimie et Biochimie

M. le Professeur D. GAUTHERON

U.E.R. des Sciences de la Nature

M. le Professeur L. DAVID

U.E.R. DE Biodynamique et Psychopédagogie

M. le Professeur R. FONTANGES

U.E.R. de Physique nucléaire

M. le Professeur A. SARAZIN

U.E.R. de Mécanique

M. le Professeur J. MATHIEU

Observatoire

M. le Professeur J. H. BIGAY

Institut Universitaire de Technologie 1

M. le Professeur B. POUYET

Institut Universitaire de Technologie 2

M. J. GALLET

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE

A Monsieur Georges MICHEL

Professeur de Chimie Biologique

à l'Université Claude Bernard, Lyon I

A ma soeur Aïda

Le présent travail a été effectué au Laboratoire de Biochimie microbienne de l'Université Claude Bernard, Lyon I que dirige Monsieur le Professeur Georges MICHEL.

Je tiens à le remercier d'avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. J'ai trouvé constamment auprès de lui une entière compréhension. Je lui suis reconnaissant pour les encouragements qu'il m'a prodigués dans les moments difficiles.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean CHOPIN pour l'honneur qu'il m'a fait en présidant mon jury de thèse.

Je remercie Mademoiselle Anne Monique GOUNOT, Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard, d'avoir bien voulu faire partie de ce jury.

J'exprime ma reconnaissance à Mademoiselle Claudette BORDET pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée au cours de ce travail. Mes remerciements vont aussi à Madame Marie-Jeanne VACHERON et à Mademoiselle Micheline GUINAND pour les nombreux conseils qu'elles m'ont toujours amicalement donnés.

INTRODUCTION

La complexité de l'enveloppe cellulaire est un des facteurs qui différencie les cellules bactériennes des cellules animales. Les cellules bactériennes possèdent en effet à l'extérieur de leur membrane cytoplasmique une paroi dont la structure et la composition chimique, même si elles varient d'une espèce à l'autre, présentent des traits caractéristiques que l'on ne retrouve chez aucune autre cellule.

Cette paroi rigide qui permet aux cellules de survivre dans des milieux très variés joue un rôle essentiellement protecteur contre des agents mécaniques y compris la congélation et maintient une forte pression osmotique interne. Elle conditionne en particulier la morphologie cellulaire de la bactérie et son intégrité. Par sa structure protéique, glyco et lipoprotéique, la paroi microbienne est le support de certains constituants antigéniques.

Bien qu'entreprise depuis longtemps déjà, l'étude de cette paroi se poursuit activement pour approfondir les détails de sa structure et de sa biosynthèse. Les connaissances acquises permettent aussi de mieux comprendre le mécanisme d'action de certains antibiotiques. Depuis 1954, un nombre considérable de travaux ont fait progresser nos connaissances de la structure des parois bactériennes. On sait maintenant que la forme des bactéries est due à une structure hautement ordonnée qui constitue un "filet" non cristallin à trois dimensions autour de la cellule : c'est une macromolécule réticulaire en forme de sac (1). Cette macromolécule ne peut constituer une entité fixe et constante. Au contraire, elle doit s'adapter à la croissance et au cycle rapide de multiplication de la cellule. Elle varie par son degré de réticulation d'une espèce à l'autre.

Parmi les hétéropolymères qui constituent ce réseau, un seul est commun à toutes les espèces bactériennes étudiées jusqu'à présent, c'est le mucopeptide ou peptidoglycane. Cet hétéropolymère considéré comme l'ossature de la paroi lui confère sa double propriété de rigidité et de perméabilité.

Ce peptidoglycane est constitué de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par des chaînes peptidiques. Les constituants fondamentaux de ce complexe sont :

1. Deux sucres aminés : la D-glucosamine et l'acide muramique (3-O-carboxyéthyl-D-glucosamine). Ce dernier est en quelque sorte le ciment de cette structure ; grâce à son groupement COOH libre il est relié aux chaînes peptidiques et grâce à sa fonction semi-aldéhydrique, il réunit les molécules de la glucosamine N-acétylée.
2. Des acides aminés dont plusieurs sont de configuration inhabituelle : l'acide D-glutamique, la L et la D-alanine qui sont présents dans la plupart des parois et un acide aminé possédant deux groupements aminés qui peut être soit l'acide 2,6 diaminopimélique (DAP) soit la lysine. Il existe donc des peptidoglycanes à DAP et d'autres à lysine.

L'acide diaminopimélique qui peut exister sous trois formes isomères : LL, meso (DL) ou DD est présent en général sous les formes meso ou LL, ces deux formes pouvant se retrouver occasionnellement

dans un même peptidoglycane (2). D'autres acides aminés additionnels : glycine, sérine, acide aspartique, thréonine etc... sont présents seulement dans certaines espèces. Il faut rappeler que les isomères D des acides aminés n'ont jamais été rencontrés dans les protéines cytoplasmiques, mais seulement dans quelques peptides antibiotiques (3). L'acide muramique et l'acide diaminopimélique sont des constituants spécifiques de la paroi cellulaire des bactéries.

Les chaînes polysaccharidiques sont formées de résidus N-acétyl-muramyle et N-acétyl-glucosaminyle alternant régulièrement et liés entre eux par des liaisons glycosidiques (β 1 $\rightarrow$ 4 (4), rappelant la structure de la cellulose (paroi végétale) et de la chitine. Ces chaînes constituent une trame sur laquelle les chaînes peptidiques viennent se fixer par une liaison amide sur le groupement carboxylique de l'acide muramique (5).

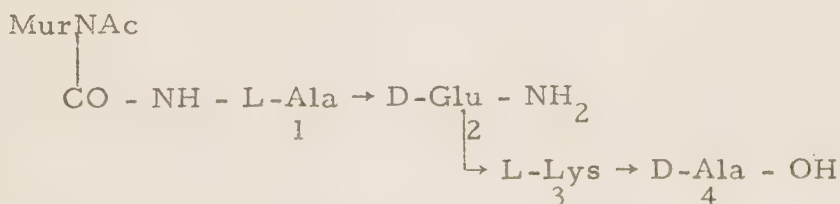
La chaîne polysaccharidique est le constituant commun au peptidoglycane de toutes les espèces bactériennes étudiées. Cependant les peptidoglycans de différentes espèces se différencient par la nature des chaînes peptidiques latérales et par les liaisons entre ces différentes chaînes.

L'action des enzymes bactériolytiques sur des parois isolées montre que le peptidoglycane est solubilisé ce qui permet d'établir sa structure (6). L'étude des produits de dégradation enzymatique a permis de construire un schéma général de la structure du peptidoglycane (figure 1). Les progrès récents dans le domaine de la biosynthèse de la paroi ont confirmé cette structure.

I. TRAVAUX ANTERIEURS

La structure générale du peptidoglycane indiquée figure 1 se retrouve dans la plupart des bactéries (7)(8)(9) avec cependant quelques variations : présence de groupements O-acétyles sur le C₆ de certains résidus d'acide N-acétyl-muramique, remplacement de l'acide N-acétyl-muramique par l'acide N-glycolyl-muramique (10)(11).

Des chaînes tétrapeptidiques sont unies au groupement COOH de l'acide muramique par une liaison amide. La séquence des acides aminés de ces peptides est généralement proche de celle du tétrapeptide type isolé de Staphylococcus aureus (6):



Chaîne polysidique

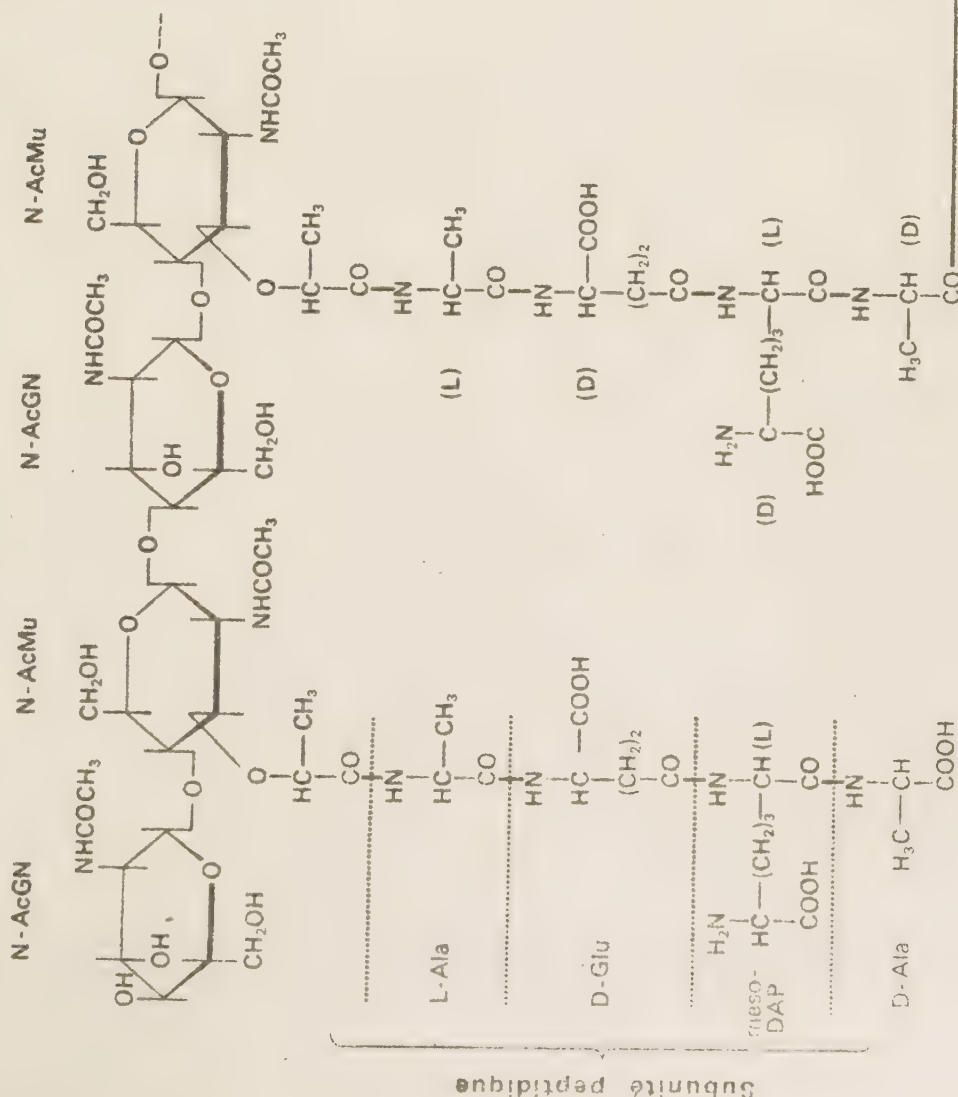
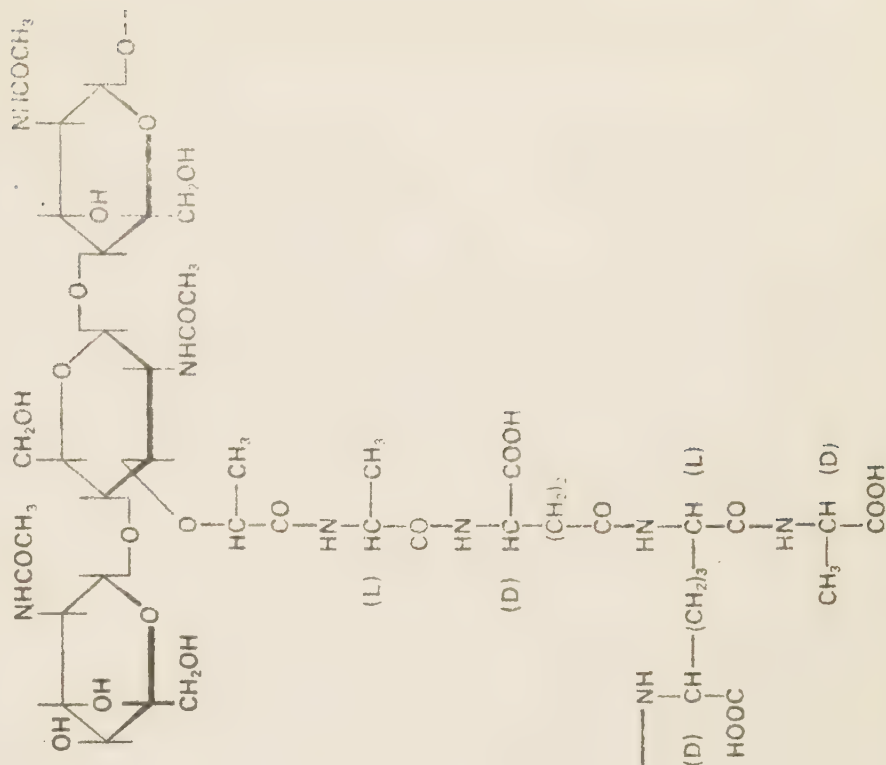


Figure 1 - Schéma de structure du peptidoglycane de la paroi cellulaire d'Escherichia Coli B N - AcGN représente le résidu N - acétyl - glucosamine, N-Ac Mu le résidu N - acétyl muramique et méso-DAP celui de l'acide méso - diaminopimélique.



On peut cependant constater dans les tétrapeptides de certaines bactéries la substitution d'un des acides aminés du peptide de S.aureus par un autre :

- La L-alanine initiale est remplacée par de la L-sérine chez Butyribacterium rettgeri (12)(13) ou par la glycine chez Microbacterium lacticum (14) et Corynebacterium poinsettiae (15).

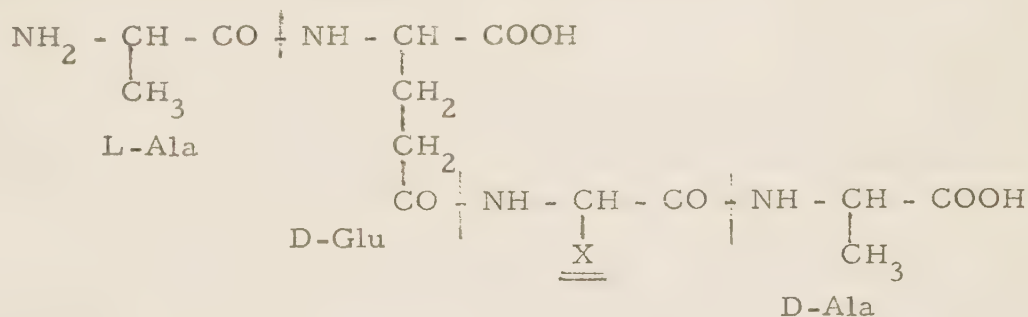
- L'acide D-glutamique, parfois remplacé par l'acide thréo-3-hydroxyglutamique (16), est amidé sur le groupe α -COOH chez S.aureus, Micrococcus roseus R 27 et Streptococcus pyogenes (17) ou porteur d'un résidu glycyk chez Micrococcus lysodeikticus (18).

- L'acide diaminé est souvent la L-lysine ou l'acide diaminopimélique (mésos ou LL) mais peut parfois être la L-ornithine (38). Plus rarement il est remplacé par un acide aminé neutre, l'homosérine (19).

- Le quatrième acide aminé est toujours D-Ala.

Il convient de noter que toutes les bactéries paraissent respecter une certaine stéréochimie dans la séquence peptidique de leurs peptidoglycans. En effet l'acide aminé en position 1 est toujours sous la forme L (L-Ala, L-Ser) ou bien il peut être la glycine. En position 2 se trouve toujours D-Glu (ou l'acide thréo-3-hydroxy-D-glutamique) dont le γ COOH est engagé dans la liaison peptidique avec l' α -NH₂ de l'acide diaminé situé en position 3. Celui-ci est toujours sous la forme L (L-Lys, L-Orn ou la partie L de meso-DAP), L'acide aminé en position 4 est toujours D-Ala.

D'une manière générale et schématique, le tétrapeptide se représente sous la forme suivante :



X = CH₂-CH₂OH : L-homosérine

CH₂-CH₂-NH₂ : acide L diaminobutyrique

CH₂-CH₂-CH₂-NH₂ : L-ornithine

CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂ : L-lysine

CH₂-CH₂-CH₂-CH_L $\begin{array}{l} \diagup \text{COOH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$: Acide LL diaminopimélique

CH₂-CH₂-CH₂-CH_D $\begin{array}{l} \diagup \text{COOH} \\ \diagdown \text{NH}_2 \end{array}$: Acide meso diaminopimélique

Structure générale du tétrapeptide de base du peptidoglycane de la paroi bactérienne.

Ces tétrapeptides sont généralement reliés entre eux par des ponts interpeptidiques de nature variable allant du COOH de la D-alanine terminale au $-NH_2$ libre de l'acide diaminé d'un tétrapeptide voisin lié à une autre molécule d'acide N-acétylmuramique.

Ce type de structure permet d'expliquer la conformation tridimensionnelle du peptidoglycane. Cependant quelques exceptions existent au niveau des points de liaison des ponts interpeptidiques. Chez B. rettgeri et quelques corynebactéries, le pont est constitué d'un acide diaminé (D-lysine ou D-ornithine), de cinq molécules de glycine chez S. aureus (6), de L-alanyl-L-alanine chez S. pyogenes ou se fait par l'intermédiaire d'un ou plusieurs peptides ayant la même séquence d'acides aminés que l'unité peptidique (M. lysodeikticus), ces ponts contribuent à la rigidité du peptidoglycane.

En outre, il apparaît que le peptidoglycane des parois contenant du meso-DAP n'a pas de ponts interpeptidiques impliquant d'autres acides aminés additionnels. La liaison intercaténaire se fait directement entre le COOH de la D-alanine terminale d'une chaîne peptidique et le groupe-ment aminé appartenant au carbone de configuration D du DAP d'une chaîne tétrapeptidique voisine (20).

II. POSITION DU PROBLEME

Nous avons résumé les points essentiels concernant la structure du peptidoglycane des parois bactériennes. Notre travail a porté sur l'étude des parois de Nocardia.

Les Nocardia sont des bactéries Gram-positives, aérobies, mésophiles, habituellement saprophytes, trouvées dans le sol. Quelques espèces peuvent être pathogènes. Elles appartiennent à la famille des Actinomycétaceae, dans l'ordre des Actinomycétales (25).

Le tableau I montre la position des Nocardia basée essentiellement sur des "critères morphologiques" et souligne la parenté phylogénique entre les mycobactéries, les Nocardia et les Streptomyces (26).

L'identification des trois genres : Mycobacterium, Nocardia, Streptomyces pose souvent des problèmes délicats en raison de similitudes morphologiques et physiologiques. Cummins et Harris ont abordé le problème de la classification des Actinomycètes dans un travail systématique. Devant les difficultés rencontrées avec les critères biologiques ou biochimiques, ces deux auteurs ont entrepris l'étude chimique des parois cellulaires de souches bactériennes variées. Ils constatent que la composition en acides aminés et en sucres de ces parois est un caractère important pour la position taxonomique (27), résultat confirmé par les travaux de Romano et Sohler (28) pour les souches de Streptomyces et de Nocardia et par les travaux de Hoare et Work (2) qui précisent la distribution des stéréoisomères de l'acide diaminopimélique chez divers actinomycètes.

TABLEAU I

<u>Ordre</u>	<u>Famille</u>	<u>Genre</u>
Actinomycetales	Mycobacteriaceae	<u>Mycobacterium</u> <u>Mycococcus</u>
	Actinomycetaceae	<u>Nocardia</u> <u>Actinomyces</u>
	Streptomycetaceae	<u>Streptomyces</u> <u>Micromonospora</u> <u>Thermoactinomyces</u>
	Actinoplanaceae	<u>Actinoplanes</u> <u>Streptosporangium</u>

Au moment où nous commençons nos recherches, la structure du peptidoglycane des mycobactéries était en partie connue (10)(11). Il renferme la séquence peptidique L-Ala-D-Glu (NH₂)-meso-DAP (NH₂)-D-Ala et l'acide muramique de la chaîne polysaccharidique est N-glycolylé.

Les mêmes acides aminés avaient été signalés chez les *Nocardia* (21)(22) mais la première étude complète de la structure du peptidoglycane a été réalisée récemment sur une souche de *Nocardia kirovani* (23)(24). Cette étude a montré une grande analogie entre le peptidoglycane des mycobactéries et celui des *Nocardia*. Nous avons déjà mentionné l'utilisation des acides aminés des parois comme critère chimiotaxonomique pour la classification de certaines bactéries et plus spécialement des Actinomycétales (27). Il fallait pour donner une valeur taxonomique à la structure du peptidoglycane du genre *Nocardia* étudier d'autres souches afin de confirmer la structure trouvée pour *N. kirovani*. Une étude comparative a été effectuée dans un premier temps sur plusieurs souches de *Nocardia* "authentiques". Au cours de cette étude, des acides aminés non constitutifs du peptidoglycane ont été trouvés notamment chez *Nocardia caviae*. Les traitements utilisés pour la purification des parois : urée, acide trichloracétique, enzymes protéolytiques, saponification, action du dodécylsulfate de sodium bouillant, ne permettent pas d'éliminer ces acides aminés. Il semblait donc exister une partie peptidique ou protéique étroitement liée au peptidoglycane.

Nos recherches ont donc été orientées vers la détermination de la structure du peptidoglycane de la paroi de *N. caviae*, puis vers l'étude de cette partie peptidique ou protéique qui accompagne le peptidoglycane.

Les méthodes que nous allons décrire permettent de préparer les parois pures et de déterminer la nature et la structure des différents constituants du peptidoglycane.

Nous exposerons ensuite les résultats obtenus avec, dans une première partie l'étude du peptidoglycane de N.caviae et dans une deuxième partie une étude partielle de la fraction peptidique ou protéique qui lui est attachée.

Nous présenterons pour terminer les conclusions que nous avons pu tirer de cette étude.

CHAPITRE I

PARTIE EXPERIMENTALE

I. CULTURES BACTERIENNES

Les souches bactériennes sont conservées à 4°C sur milieu de Jensen (milieu solide à base de jaune d'oeuf, de fécule de pomme de terre, de glycérine, d'asparagine, de vert de malachite et de certains sels minéraux) ou sur milieu solide de gélose nutritive (contenant 0,4 % d'asparagine et 2 % de glucose).

Les *Nocardia* sont ensuite cultivés sur milieu de Sauton (29), milieu liquide minéral dont la composition est la suivante :

Asparagine 4 g
 Acide citrique 2 g
 Phosphate dipotassique 0,5 g
 Sulfate de magnésium 0,5 g
 Citrate de fer ammoniacal 0,05 g
 Sulfate de zinc 0,1 mg
 Chlorure de calcium 0,5 mg
 Sulfate de cuivre 0,1 mg
 Glycérine pure 60 g
 Eau distillée q.s.p. 1 litre

Le pH du milieu est ajusté à 7,2-7,4 par de l'ammoniaque diluée. Les cultures sont faites en boîtes de Roux contenant 200 ml de milieu, à 37°. Selon le développement des colonies bactériennes, on obtient des voiles plus ou moins plissés de couleurs variables d'une espèce à l'autre. Au bout de 10 jours environ, les bactéries sont séparées du milieu nutritif par filtration et lavées à l'eau distillée.

II. TECHNIQUES DE PREPARATION DES PAROIS.

La préparation des parois bactériennes pures comporte souvent de longues opérations mettant en oeuvre des processus nombreux et variés.

En 1887, Vincenzi fut le premier à isoler une paroi microbienne de Bacillus subtilis. Depuis, plusieurs chercheurs ont élaboré différents procédés pour la préparation des parois et l'intérêt de ces procédés empiriques pouvait être évalué d'après le degré de purification et le rendement. Nous avons utilisé 3 techniques de préparation suivant les destinées des parois.

1ère méthode de préparation des parois.

Salton et Horne utilisaient en 1951 (30) les vibrations ultrasoniques pour désintégrer les microorganismes et vider les cellules de leur contenu cytoplasmique. Cette technique a l'avantage d'un rendement relativement élevé et elle permet en plus de manipuler à des températures assez basses limitant ainsi les risques d'autolyse. Ce procédé est utilisé conjointement avec la centrifugation différentielle pour séparer les différents produits de désintégration.

Nous avons pu préparer avec cette technique les parois de N. caviae. Le schéma p. 12 montre les étapes successives au cours de l'obtention de ces parois à l'état brut.

La désintégration par ultra-sons est réalisée avec un appareil MSE 500 W. Les microorganismes sont mis en suspension dans du tampon Tris (2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol) pH 7,5 dans des cellules refroidies à 0° à raison de 0,5 g de microbes humides par ml de tampon.

Le degré de désintégration des bactéries est suivi et contrôlé par microscopie à contraste de phase ou par microscopie électronique. Dans ce dernier cas on remarque que les fragments de parois sont sous forme de petits sacs parfois déchiquetés ayant conservé la forme des cellules-mères. On remarque au microscope à contraste de phase l'absence de réfringence pour les parois contrairement à ce qui est observé avec la cellule-mère.

Par centrifugations différentielles^{*}, les parois cellulaires sont débarrassées dans un premier temps des cellules restées intactes, puis dans un deuxième temps à grande accélération, on peut séparer les débris membranaires et cytoplasmiques qui restent en suspension, les parois microbiennes formant un culot.

Après la dernière centrifugation les parois sont reprises dans un volume d'eau minimum puis congelées et lyophilisées : ce sont les parois Po ou parois brutes.

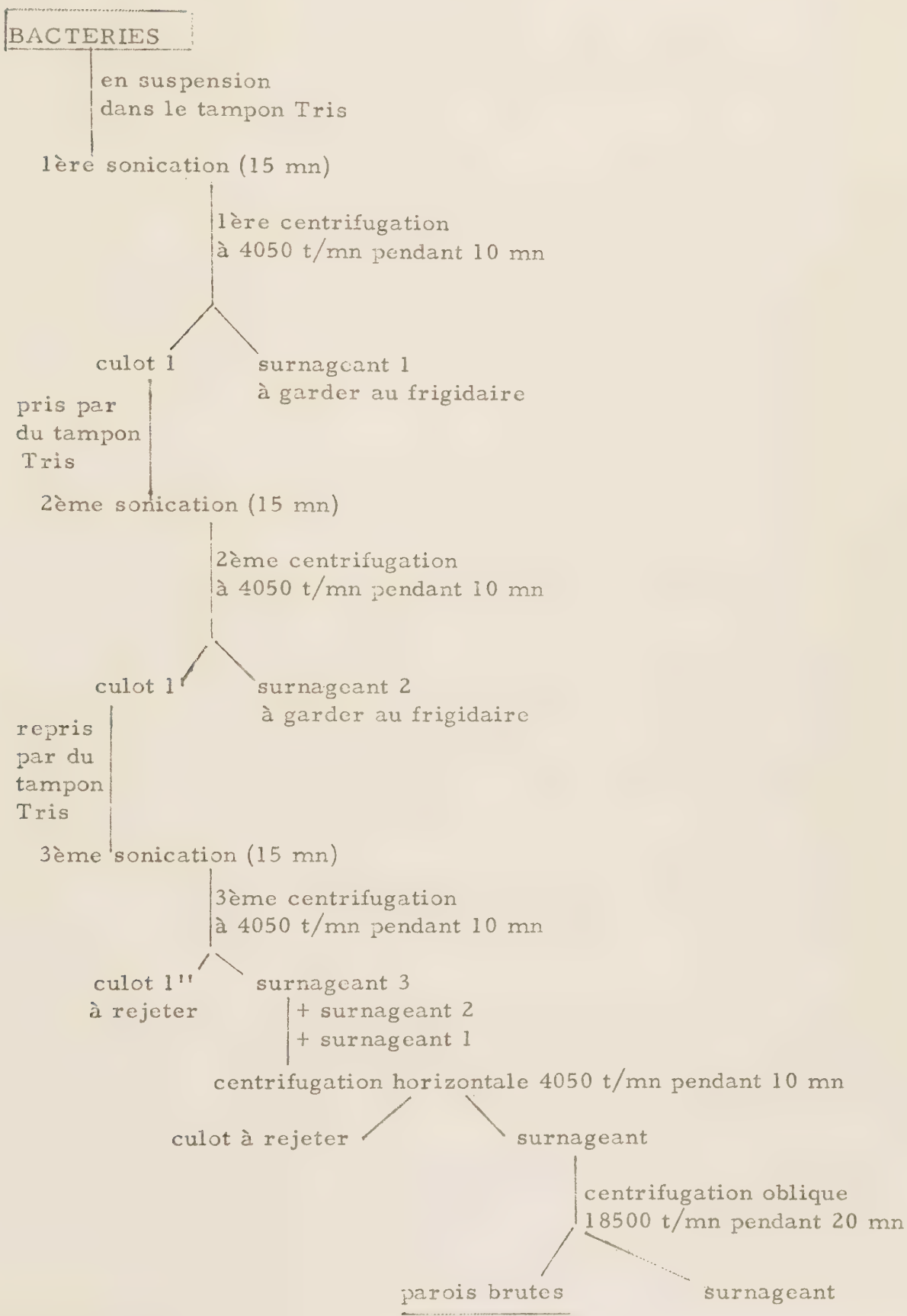
Purification des parois

- Les parois sont traitées à l'urée 60 % dans le tampon Tris à 37°C pendant 4 heures, le rôle de l'urée étant de dénaturer les protéines en les exposant mieux aux attaques des enzymes protéolytiques.

- Après plusieurs lavages à l'eau distillée, les parois sont incubées avec la trypsine (1 mg d'enzyme pour 5 mg de substrat) dans le tampon phosphate disodique M/15 pH 7,5 à 37° pendant 5 heures sous agitation. La trypsine débarrasse les parois des débris cytoplasmiques adhérents de nature protéique.

* La centrifugation horizontale a été effectuée avec un appareil Jouan réfrigéré K 63 F et la centrifugation oblique à l'aide d'une centrifugeuse "International".

Schéma de la préparation des parois brutes



- Lavées plusieurs fois à l'eau distillée, les parois sont réincubées avec la pronase (3 mg d'enzyme pour 5 mg de parois) à 37° pendant 24 heures. Le pH est ajusté à 8,4. Cette incubation se fait en présence d'ions Ca^{++} (31). Les parois récupérées et lyophilisées, après lavages à l'eau, constituent les parois P_1 ou parois purifiées. Elles représentent 8 à 10 % du poids sec des bactéries.

- Ces parois sont épuisées successivement par les mélanges de solvants : alcool-éther (1:1), chloroforme, chloroforme-méthanol (1:1) à température ambiante et sous agitation. Cette extraction fournit 18,3 % de lipides pariétaux à partir des parois totales. Le produit restant constitue les parois P_2 ou parois délipidées. Celles-ci traitées par la potasse méthanolique à 0,5 % pendant 48 heures à 37°C perdent 25 % de leur poids correspondant à des lipides liés.

Le résidu lavé plusieurs fois à l'eau distillée et lyophilisé donne les parois pures P_3 .

2 ème méthode de préparation des parois.

Une méthode a été proposée par Parck et Hancock en 1960 (32) avec Staphylococcus aureus. C'est une méthode microanalytique rapide qui porte sur 2 à 3 mg de bactéries.

Elle consiste à faire agir l'acide trichloracétique (TCA) à 5 % à 0° pendant 10 minutes puis l'éthanol à 75 % à température ambiante pendant 10 minutes, puis le TCA à 90°C pendant 6 minutes. Le résidu récupéré par centrifugation à 4000 g pendant 10 minutes est incubé avec la trypsine pH 7,7 - 8 à 37°C pendant 2 heures. Après centrifugation à 4000 g on obtient un culot qui, lavé plusieurs fois à l'eau distillée et lyophilisé, constitue les parois purifiées.

Nous avons adapté cette technique sur les souches suivantes de *Nocardia* :

N.asteroides ATCC 9969, N.brasiliensis ATCC 733, N.caviae I.M.1381, N.farcinica I.M.1377, N.erythropolis A 4 et N.kirovani I.M.1374.

Une simple modification est à signaler, c'est la substitution de la trypsine par la pronase, les conditions d'incubation étant celles de Conchie et coll. (31) indiquées précédemment. Des parois de N.kirovani préparées par désintégration ultrasonique selon Salton et Horne (30) ont été utilisées comme témoin.

Cette technique nous a permis d'obtenir rapidement les parois des différentes souches de *Nocardia* en vue d'une étude comparative sur leur composition globale en acides aminés.

3 ème méthode de préparation des parois.

Cette technique a été préconisée par Braun et Sieglin (33). On délipide d'abord les bactéries à température ambiante par extractions successives avec alcool-éther (1:1), chloroforme et chloroforme-méthanol (1:1). Après lavage à l'eau distillée, les bactéries délipidées sont mises en suspension dans l'eau et désintégrées à froid par les ultra-sons.

Le broyat est ensuite centrifugé à 22000 g pendant 1 heure à 4°C en présence d'un complexant pour les ions Mg^{++} , l'EDTA,* de manière à avoir une concentration finale en EDTA 0,01 M.

Le résidu, lavé 3 fois à l'eau distillée, est traité par une solution bouillante de SDS à 4 %*. On refroidit à température ambiante et on laisse reposer pendant 1 nuit. Après centrifugation à 22000 g pendant 1 h. à 15°C le culot lavé 4 fois au moins à l'eau distillée et lyophilisé représente les parois purifiées.

III. TECHNIQUES D'ETUDE DU PEPTIDOGLYCANE ET DE LA PARTIE PEPTIDIQUE.

Techniques de dosage des glucides.

A. Dosage du pouvoir réducteur.

Ce dosage est effectué selon la méthode de Park et Johnson (34) au ferricyanure. L'échantillon contenant environ 2 à 10 nmoles de N-acétylglucosamine dans un volume de 200 μ l est additionné de 200 μ l d'un mélange frais 1:1 (v/v) des réactifs :

- ferricyanure de potassium 0,05 %
- carbonate de sodium - cyanure de potassium 0,53 %
et 0,065 %.

Après agitation et chauffage 15 minutes dans un bain-marie bouillant, on ajoute :

- 500 μ l du réactif contenant le sulfate de fer ammoniacal (0,15 % + 3 ml de Brij à 35 % dans H_2SO_4 0,15 N).

L'échantillon est homogénéisé par agitation sur un vibreur, après 15 minutes à température ambiante, la densité optique est mesurée à 690 nm.

Il faut noter que le disaccharide N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique a un pouvoir réducteur équivalent environ à 1,5 fois celui de la glucosamine (35).

Les mesures d'absorption ont été réalisées au moyen d'un spectrophotomètre Beckman.

* EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique
SDS : dodécylsulfate de sodium

B. Microdosage des hexosamines.

Le procédé consiste à acétyler les hexosamines dans un premier temps, puis à leur appliquer la réaction des sucres acétamidés de Morgan-Elson (36) mise au point par Ghuysen et coll (37).

L'estimation du contenu en hexosamines totales d'un polysaccharide exige d'abord une hydrolyse acide.

L'échantillon contenant l'équivalent de 20 à 50 nmoles d'hexosamines ainsi que des témoins de glucosamine (25 nmoles) est hydrolysé par 50 μ l d'HCl 6 N à 100°C pendant 3 heures en tube scellé.

L'acide est éliminé ensuite par évaporation sous vide en présence de pastilles de soude et de P_2O_5 . Le résidu est dissous dans 30 μ l d'eau distillée et réacétylé par 10 μ l d'une solution fraîche d'anhydride acétique à 5 % (v/v) en présence de 10 μ l d'une solution saturée de bicarbonate de sodium. L'acétylation se fait en 10 minutes à température ordinaire et les tubes sont ensuite placés dans un bain-marie bouillant pendant 3 minutes pour détruire l'excès d'anhydride acétique.

Après l'addition de 50 μ l de tétraborate de potassium à 5 % (P/V) et passage 7 minutes à 100°, les tubes refroidis reçoivent 500 μ l d'acide acétique et 200 μ l du réactif de Morgan-Elson préparé de la façon suivante :

16 g de p.diméthylaminobenzaldéhyde sont dissous dans de l'acide acétique de manière à obtenir un volume total de 95 ml, puis 5 ml d'HCl 12 N sont ajoutés. Pour la réaction qualitative de Morgan-Elson, ce réactif est dilué dans les proportions de 1:8 dans l'acide acétique concentré.

Après 20 minutes d'incubation à 37°C pour obtenir la coloration maximale, la coloration est mesurée à 585 nm.

Techniques de dosage des acides aminés.

Le dosage des acides aminés totaux est basé sur la réaction des groupements aminés avec le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB : 130 μ l dilués dans 10 ml d'éthanol absolu). Dans ce cas, l'hydrolyse précède la réaction au DNFB.

A. Dosage par les DNP dérivés.

L'échantillon contenant environ 25 nmoles de chaque acide aminé présent dans les parois est hydrolysé à 120°C par HCl 6N pendant 20 heures en tube scellé.

Après évaporation de l'acide sous vide en présence de pastilles de soude et de P_2O_5 , le résidu est dissous dans 100 μ l d'eau. 25 μ l de tétraborate de potassium à 5 % et 10 μ l du réactif DNFB dilué 0,1 M dans l'éthanol sont ajoutés successivement. On agite, le pH final étant 9,2 environ. Après 30 minutes à 60°C et à l'obscurité, 125 μ l d'HCl 12N sont ajoutés et les dérivés DNP des acides aminés présents dans l'échantillon sont extraits 3 fois à l'éther. Après évaporation de l'éther, le résidu est repris dans le méthanol et chromatographié sur plaque de gel de silice dans le solvant chloroforme-méthanol-acide acétique (88:10:2). La migration du solvant est maintenue à l'obscurité.

Après séchage de la plaque, les mono-DNP dérivés sont recueillis dans des tubes à hémolyse et élués du gel de silice par agitation vigoureuse dans 1 ml du mélange : éthanol-eau-ammoniaque concentré (100:100:0,54). Après centrifugation à 1700 g, la densité optique des solutions est mesurée à 360 nm.

Les opérations doivent être conduites à l'obscurité pour éviter la photolyse des dérivés dinitrophénylés.

Pour tenir compte de la destruction éventuelle due à l'hydrolyse, des témoins d'acides aminés sont traités parallèlement par HCl 6N puis par le DNFB dans les mêmes conditions opératoires.

B. Dosage global des groupements $-NH_2$ terminaux.

Les échantillons contenant 25 à 50 néquivalents de groupement aminé sont mis en solution dans 200 μ l d'eau. Lorsqu'il s'agit d'éluats de colonne de Sephadex par l'acide acétique 0,1 N, les prélèvements sont neutralisés par 100 μ l de soude 0,2 N. 25 μ l d'une solution de $K_2B_4O_7$ à 5 % et 10 μ l de DNFB 0,1 M sont ensuite ajoutés. La réaction se fait à pH alcalin. Après agitation, on place immédiatement dans un bain-marie à 60°C pendant 30 minutes à l'obscurité.

Les tubes sont ensuite acidifiés par 700 μ l de HCl 3N et les densités optiques sont mesurées à 420 nm.

L'opération est effectuée en présence de témoins d'alanine à 25 nmoles.

C. Dosage des acides aminés à l'auto-analyseur Technicon.

L'auto-analyseur Technicon permet une analyse qualitative et surtout quantitative des acides aminés par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions. Le dosage porte sur des quantités voisines de 0,25 μ mole d'acide aminé.

L'hydrolysate de l'échantillon est amené à sec puis repris dans 100 μ l d'HCl 0,1 N et chargé sur la colonne thermostatée par circulation d'eau dans une double enveloppe. Les acides aminés sont élués de la résine par des solutions de tampons à base de citrate de sodium 0,2 N formant un gradient continu de pH de 2,75 à 6,1. Une micropompe proportionnante règle le débit d'élution. L'élution se fait à 40°C pour Asp, Thr, Ser et à 60°C pour les autres acides aminés.

L'éluat est mélangé à une solution de ninhydrine et chauffé sous atmosphère d'azote dans un bain d'huile à 95°C. La détection de chaque acide aminé se fait par colorimétrie (39). La densité optique est mesurée dans un spectrophotomètre à 440 et 570 nm. Les résultats sont enregistrés par points.

Des conditions parfaitement contrôlées et reproductibles sont indispensables pour que chaque acide aminé puisse être identifié simplement par son emplacement sur la courbe, c'est-à-dire par le volume de la solution tampon nécessaire à son élution. Les acides aminés sont donc identifiés par la position de leurs pics en comparaison avec une courbe standard faite dans les mêmes conditions. Leur dosage quantitatif s'effectue par intégration de la surface de chaque pic, compte tenu

d'une correction pour le rendement colorimétrique. Cette correction est faite par rapport à la norleucine.

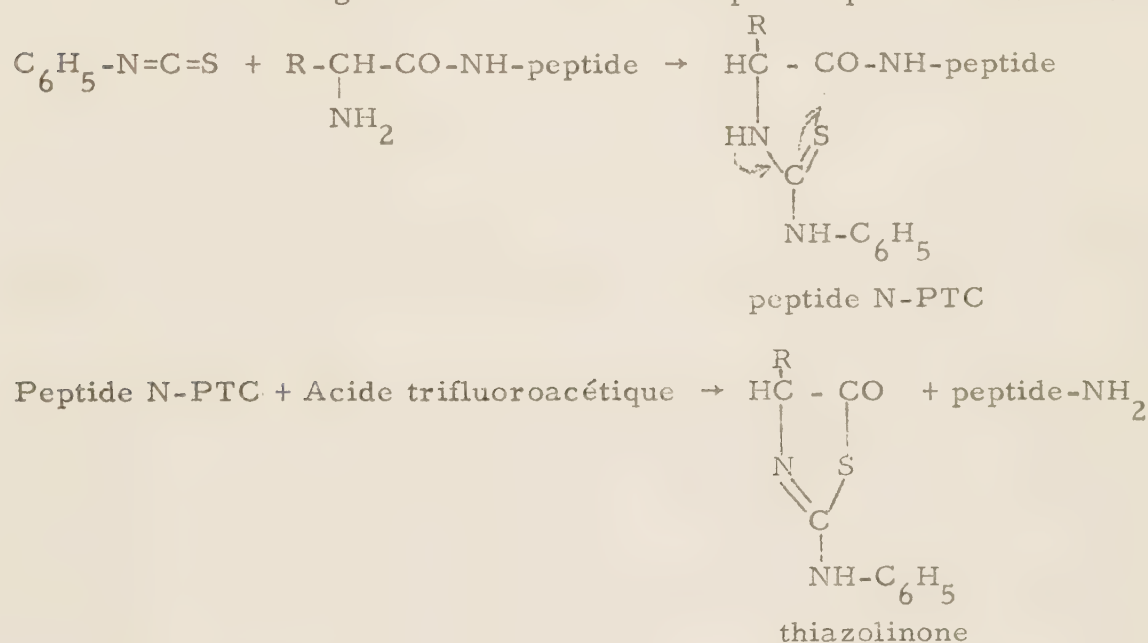
L'analyse automatique des acides aminés peut durer de 5 à 10 heures selon les débits d'élution et la nature des acides aminés présents dans l'échantillon. Les acides aminés acides sont élués en premier, les neutres ensuite et les acides aminés basiques en fin.

D. Dégradation récurrente des peptides (dégradation d'Edman) selon Gray et Smith (40).

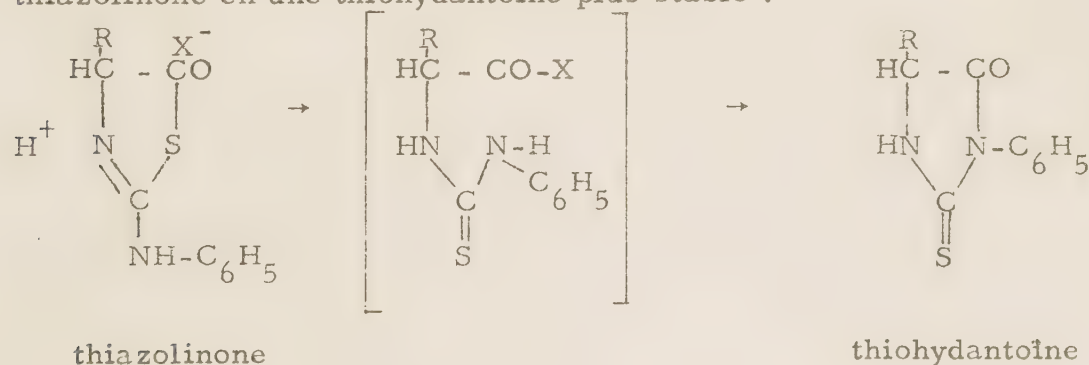
La dégradation d'Edman permet d'enlever les aminoacides à partir de l'extrémité N-terminale et de les identifier sans détruire complètement la chaîne peptidique.

Dans ce procédé, on fait réagir le peptide dont on étudie la séquence avec le phénylthiocyanate pour obtenir un peptide N-phénylthiocarbamylé. En milieu acide anhydre ce dérivé se cyclise en une thiazolinone, ce qui entraîne la rupture de la liaison peptidique terminale.

La réaction globale est schématisée par l'équation suivante :

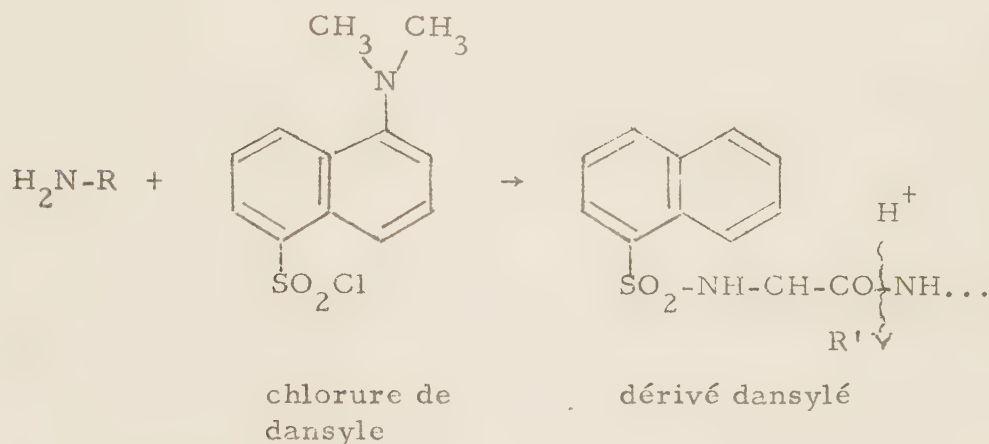


Au cours de la même opération il se produit un réarrangement de la thiazolinone en une thiohydantoïne plus stable :



La chaîne peptidique résiduelle diminuée d'un résidu acide aminé après séparation de la thiohydantoïne peut être traitée à nouveau avec du PITC. Les cycles se répètent selon le nombre des acides aminés formant le peptide étudié.

Sur le peptide initial et sur les peptides résiduels après chaque dégradation on détermine la nature de l'acide aminé N-terminal par dansylation. La dansylation est effectuée par action du chlorure de 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfonyle sur le peptide :



En outre, on peut identifier l'acide aminé N-terminal par différence. A cet effet, une petite fraction du peptide résiduel est prélevée et sa composition en aminoacides déterminée après chaque cycle d'Edman.

25 à 50 nmoles exprimées en groupements NH_2 -terminaux de peptides sont dissous dans 50 μl du mélange suivant fraîchement préparé : PITC : 30 μl , pyridine : 600 μl , eau : 400 μl . On incube à 50°C pendant 45 minutes. Après séchage à 70° sous vide, la cyclisation est effectuée pendant 10 minutes en ajoutant 50 μl d'acide trifluoroacétique anhydre. L'acide est éliminé ensuite par séchage sous vide. Après la réaction, l'échantillon dissous dans 50 μl d'eau est extrait 3 fois par l'acétate d'éthyle et séché sous vide. On y ajoute 15 μl de bicarbonate de sodium 0,2 M puis on sèche à nouveau sous vide.

On reprend le peptide par 15 μl d'eau et le pH est ajusté à 7,5-8 par addition de NaHCO_3 . On ajoute 15 μl d'une solution de chlorure de dansyle à 3 mg/ml dans l'acétone. La réaction de dansylation s'effectue à 50° pendant 15 minutes. L'échantillon séché sous vide est hydrolysé par HCl 6N à 110°C pendant une nuit. Après élimination de l'acide en évaporant à sec sous vide, le dérivé dansylé de l'acide aminé est extrait par l'acétate d'éthyle. Il est caractérisé par chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le solvant : benzène-pyridine-acide acétique (80:20:2) en présence de témoins de dérivés dansylés d'acides aminés. Ces dérivés donnent des taches fluorescentes en U.V.

Techniques chromatographiques

A. Chromatographie sur colonne de Sephadex.

La technique de fractionnement et d'isolement des constituants du peptidoglycane est basée essentiellement sur l'utilisation du gel de Sephadex. Ce sont des gels de dextrane de porosités variées. La filtration sur de tels gels permet une séparation en fonction des poids moléculaires.

Sur le Sephadex G 25 par exemple, sont chromatographiées les substances d'un poids moléculaire entre 1000 et 5000 tandis que pour G 50 celles d'un poids moléculaire entre 5000 et 10000. Les substances d'un poids moléculaire plus élevé ne sont pas retenues sur la colonne et sont par conséquent immédiatement exclues des mailles du gel.

Nous avons utilisé les colonnes (2,5 x 160 cm) de Sephadex G 25, G 50 et G 25 - G 50 couplées. Chaque colonne est caractérisée par le volume d'élution d'une substance à haut poids moléculaire exclue du gel (volume mort V_0) et le volume d'élution d'un sel (V_i). V_e étant le volume d'élution de la substance chromatographiée.

Pour chaque molécule il y a un coefficient de distribution qui est donné par la formule suivante :

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_i - V_0}$$

Les gels peuvent être équilibrés avec de l'eau, des solutions salines (LiCl 0,1 M) ou des solutions acides (Acide acétique 0,1 M). L'élution est effectuée avec les mêmes solutions d'équilibrage. Les éluants autres que l'eau sont utilisés pour obtenir des pics étroits et réduire les interactions possibles entre le gel et les substances à séparer surtout quand il s'agit de produits contenant des groupements $-NH_2$ libres.

B. Chromatographie par échange d'ions sur colonne de résine cationique ou anionique.

- Résine Chromobeads C 2 : résine de polystyrène sulfoné utilisée pour la séparation des acides aminés lors du dosage à l'autoanalyseur Technicon. La résine est équilibrée avec un tampon approprié. Le mélange d'acides aminés est introduit sur la colonne à pH 2 - 2,5. L'élution est réalisée en modifiant graduellement le pH et la force ionique du tampon et éventuellement la température.

- Résine Aminex Q 15 S : résine sulfonée cationique employée pour le fractionnement des peptides. La colonne de diamètre 1 cm et hauteur 20 cm est maintenue à 50°C. La séparation est effectuée sur environ 3 μ moles de peptides dissous dans 2 ml d'eau. Le pH est amené à 2,5 à l'aide d'acide formique. La solution est déposée au sommet de la colonne et l'élution est réalisée par un gradient linéaire de pH effectué avec : 300 ml de tampon pyridine-acide acétique pH 3,1, 0,2 M en pyri-

dine, 300 ml de tampon pyridine-acide acétique pH 5,1, 2 M en pyridine. Des fractions de 1 ml sont recueillies et une partie aliquote des fractions impaires est dosée par la ninhydrine après hydrolyse alcaline.

Préparation des réactifs :

- tampon pyridine-acide acétique 0,2 M en pyridine pH 3,1 :
pyridine 16,1 ml ; acide acétique 250 ml ; eau q.s.p. 1000 ml
- tampon pyridine acide acétique 2 M en pyridine pH 5,1 :
pyridine 161 ml ; acide acétique 125 ml ; eau q.s.p. 1000 ml
- tampon acétate pH 5,5 :
544 g d'acétate de sodium, 3 H₂O ; 100 ml acide acétique ; eau q.s.p. 1000 ml.

Dosage des aminoacides par hydrolyse alcaline:

On prélève 58 µl par fraction et on ajoute 200 µl de NaOH 2,5 N. On laisse 2 heures 30 dans un bain-marie bouillant. Après avoir neutralisé par 200 µl d'acide acétique à 30 %, on ajoute 200 µl de la solution suivante : 500 mg de ninhydrine, 75 mg d'hydrindantine, 18,75 ml de méthylcellosolve, 6,25 ml de tampon acétate pH 5,5. On laisse 15 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on ajoute 1 ml d'éthanol 50 %. La densité optique est lue à 570 nm.

- Résine de Dowex 2 X 8 (100-200 mesh). C'est une résine échangeuse d'anions, elle est utilisée dans une colonne de 1,8 x 25 cm pour la désalification des peptides selon Drèze et Boeck (41). Cette résine est utilisée sous sa forme alcaline. Elle permet l'élution et la séparation quantitative des peptides par l'acide acétique normal. La première fraction acide contient le produit désalifié. La résine est régénérée ensuite par des lavages avec HCl N et NaOH 2 N décarbonatée.

C. Chromatographie sur papier.

Cette chromatographie a été notamment utilisée pour l'identification des aminoacides et des sucres. Les chromatographies descendantes monodimensionnelles ou bidimensionnelles sont effectuées sur papier Whatman n° 1. Nous avons également employé pour certaines séparations le papier Whatman n° 3 MM.

Les chromatographies préparatives ont été faites sur papier Whatman n° 1 (43 x 57 cm). Les dépôts sont effectués en points rapprochés de 0,5 à 1 cm. Une bande à chaque extrémité de la feuille et en son milieu sont révélées. L'élution par l'eau distillée des bandes situées au niveau des différentes taches permet l'obtention des divers constituants du mélange déposé. Leur pureté est vérifiée par chromatographie dans un autre solvant.

D. Chromatographie sur couche mince.

La préparation de couches adsorbantes neutres d'épaisseur constante a été réalisée avec un appareil Desaga (Heidelberg, Allemagne). L'épaisseur des plaques est de 0,25 mm pour la séparation des sucres, des peptides et des acides aminés et de 0,5 mm pour d'autres utilisations : dérivés DNP des acides aminés, lipides.

Les adsorbants utilisés sont les suivants :

- la poudre de cellulose MN 300 G
- le gel de silice G (Merck).

Les plaques sont activées 1 heure à 110° avant utilisation. Les solvants fréquemment utilisés pour le développement des chromatogrammes sont :

- butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24)
- acide isobutyrique-ammoniaque 0,5 N (5:3)
- butanol-acide acétique-eau (5:1:2).

Révélation des chromatogrammes :

- Les groupements $-NH_2$ sont révélés par vaporisation d'une solution de ninhydrine préparée selon Russel (42) en mélangeant extemporanément des volumes égaux des deux solutions A et B et en chauffant à 110° pendant 10 minutes. Solution A : solution à 0,33 % de ninhydrine dans le butanol tertiaire ; solution B : acide acétique-eau-pyridine (10:50:50).

- Les sucres sont mis en évidence par le malonate d'aniline en solution dans l'éthanol : ils apparaissent en brun ou bien par vaporisation d'une solution de naphtorésorcinol dans l'alcool en milieu sulfurique : naphtorésorcinol : 20 mg, éthanol : 10 ml, H_2SO_4 concentré : 0,4 ml.

- Les hexosamines sont détectées par le réactif de Sharon (47) : une solution de NaOH 0,5 N dans l'éthanol-propanol (6:4).

Electrophorèse.

Nous avons utilisé pour l'électrophorèse le papier Whatman 3 MM (40 x 40 cm) avec un appareil Pherograph. Le tampon le plus fréquemment utilisé est pyridine-acide acétique-eau (2,5:9:1000) à pH 4, en particulier pour séparer les peptides selon leurs degrés d'amidification.

Techniques diverses

Perméthylation par la méthode d'Hakomori (43).

On prélève 30 mg d'hydruure de sodium. Après 3 lavages à l'éther séché plusieurs fois sur sodium, on ajoute 0,4 ml de diméthylsulfoxyde préalablement distillé sur hydruure de calcium. Après 5 minutes à 80°, on ajoute le composé à méthyler dissous dans 50 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO) à température ambiante et on maintient sous atmosphère d'azote. Au bout de 15 minutes, 0,3 ml de ICH_3 sont ajoutés, la solution devient incolore. On reprend par 300 μ l de chloroforme saturé d'eau et 300 μ l d'eau saturée de chloroforme. Après agitation on prélève la phase aqueuse supérieure et on extrait 5 fois la phase chloroformique inférieure par 300 à 500 μ l d'eau saturée de chloroforme. On sèche la phase chloroformique sur du sulfate de sodium puis on évapore le chloroforme par un courant d'azote. On place sous vide en présence de P_2O_5 pendant 5 à 10 minutes. Le dérivé ainsi perméthylé est étudié par spectrométrie de masse.

Techniques hydrolytiques.

Nous avons utilisé essentiellement l'hydrolyse acide par l'acide chlorhydrique. Suivant les cas, les hydrolyses suivantes ont été réalisées :

- hydrolyse par HCl N pendant 16 h à 100° (dosage des sucres neutres).
- hydrolyse par HCl 6N pendant 16 h à 110° (dosage des acides aminés).
- hydrolyse par HCl 0,1 N pendant 12 h à 60° (purification des parois par séparation des polysaccharides).
- hydrolyse par HCl 4N pendant 45 minutes à 100° (hydrolyse ménagée des peptides).
- hydrolyse par HCl 3 N pendant 3 heures à 95° (dosage des hexosamines).

CHAPITRE II

ETUDE DU PEPTIDOGLYCANE

ETUDE DES AMINOACIDES DES PAROIS DE DIFFERENTES SOUCHES DE NOCARDIA

La composition globale en aminoacides des parois bactériennes a été étudiée par Cummins et Harris en 1956 (27). Ils mentionnent la présence d'alanine, acide glutamique et acide diaminopimélique chez des *Nocardia*, mycobactéries et corynébactéries. La lysine remplace l'acide diaminopimélique chez les *Actinomyces*. Kandler en 1967 (44) dans une recherche systématique de la séquence peptidique des parois de plusieurs bactéries Gram-positives confirme la présence d'acide aspartique dans la sous-unité peptidique de la paroi de *Lactobacillus acidophilus*. De plus il constate chez d'autres *Lactobacillus* que l'acide glutamique et l'acide aspartique sont amidés.

M. J. Vacheron en 1971 au cours d'une étude sur la paroi de *Nocardia kirovani* signale en outre la présence de traces d'acide aspartique, thréonine, sérine, glycocolle et valine qui représentent moins de 6 % des aminoacides totaux dans les parois purifiées (24).

Nous avons dans un premier temps étudié la composition globale en aminoacides des parois de différents *Nocardia* :

N. asteroides ATCC 9969, *N. brasiliensis* ATCC 733, *N. farcinica* I.M. 1377, *N. erythropolis* A 4, *N. caviae* I.M. 1381.

Les parois des différentes souches ont été préparées selon la microméthode de Parck et Hancock (32). Les divers lots de parois étaient hydrolysés par HCl 6 N à 110° C pendant une nuit puis les aminoacides identifiés par chromatographie sur couche mince de poudre de cellulose et dosés par la méthode de Moore et Stein (39) à l'autoanalyseur Technicon.

Dans toutes les souches on trouve l'alanine, l'acide glutamique et l'acide diaminopimélique dans des proportions sensiblement identiques. Par contre, nous remarquons la présence d'autres acides aminés en proportions variables tels que Asp, Thr, Ser, Gly, Val, Leu et Phe. La souche la plus riche en acides aminés additionnels est *Nocardia caviae* qui renferme 20 à 25 % de ces aminoacides. Nous avons donc étudié plus complètement les parois de *Nocardia caviae*.

ETUDE DU PEPTIDOGLYCANE DE *N. CAVIAE*

Nous avons préparé les parois purifiées de *N. caviae* par la méthode de Braun et Sieglin (33). On obtient 4 % de parois lyophilisées par rapport au poids sec des bactéries : ce sont les parois purifiées P_1 . L'acide chlorhydrique 0,1 N à 60°C pendant 12 heures élimine les sucres neutres. Après lavage successivement à l'eau distillée, à l'acétone et à l'éther et séchage du résidu, on obtient les parois pures P_2 : la moitié environ des parois est solubilisée par l'action d'HCl 0,1 N. La fraction soluble concentrée servira ultérieurement à l'étude des sucres neutres.

Nous avons adopté pour l'étude du peptidoglycane le processus de dégradation par les enzymes bactériolytiques spécifiques : l'enzyme AL 1 de *Myxobacter* et le lysozyme. A la suite de cette dégradation on peut obtenir des fragments du peptidoglycane purifiés que l'on peut séparer et dont on détermine la structure.

A. Action enzymatique de *Myxobacter* AL₁ (45)(46)

L'enzyme AL 1 de *Myxobacter* possède une activité amidasique. Elle coupe les liaisons entre l'acide muramique et l'alanine (fig. 2, p. 26). Elle n'a pas d'action au niveau des hexosamines et les chaînes polysaccharidiques restent intactes. Cependant, elle peut avoir une activité endopeptidasique qui porterait surtout sur les ponts interpeptidiques constitués par l'intermédiaire d'un ou plusieurs acides aminés (6).

Plusieurs échantillons de parois P_2 sont incubés dans un premier temps en présence de quantités croissantes d'enzyme dans le tampon véronal 0,01 M pH 9 pendant 24 heures à 37°C. La lyse des parois est évaluée par turbidimétrie. Ceci permet de préciser les conditions optimales de l'action de l'enzyme et sa concentration exigée.

50 mg de parois P_2 sont incubés avec 39000 unités lytiques de l'enzyme de *Myxobacter* dans 25 ml de tampon véronal 0,01 M à pH 9 à 37° pendant 24 heures sous agitation. 91 % des parois subissent la lyse enzymatique. La solution est amenée à un volume de 4 ml par évaporation à 37° C sous vide puis fractionnée par passage sur colonne de Séphadex G 25 ($V_0 = 300$ ml, $V_i = 650$ ml) dans l'acide acétique 0,1 N. L'élution est effectuée par la même solution d'équilibrage et à la température ambiante. Le débit d'élution est de 80 ml /heure. Les fractions recueillies sont de 5 ml. Les groupements $-NH_2$ terminaux sont dosés par leurs DNP dérivés et les hexosamines par la méthode de Morgan-Elson. La courbe d'élution schématisée par la figure 4 (p. 27) indique

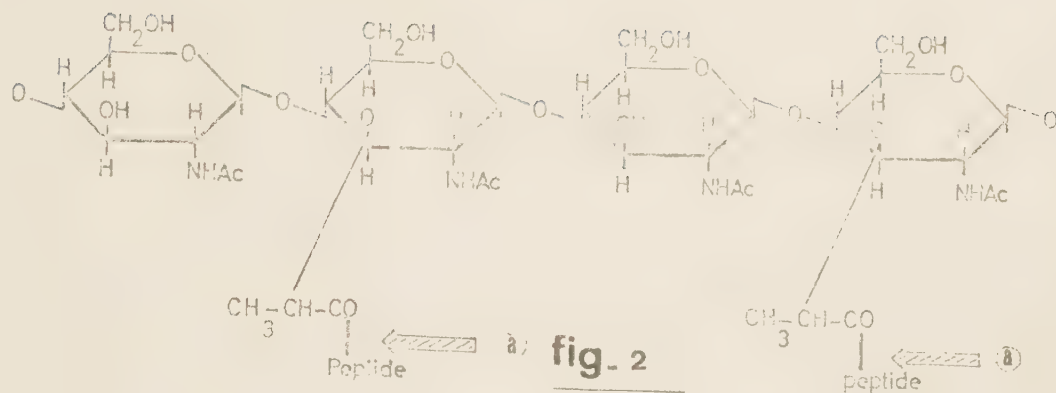


Schéma de l'action de l'enzyme ALI de Myxobacter sur le peptidoglycane.

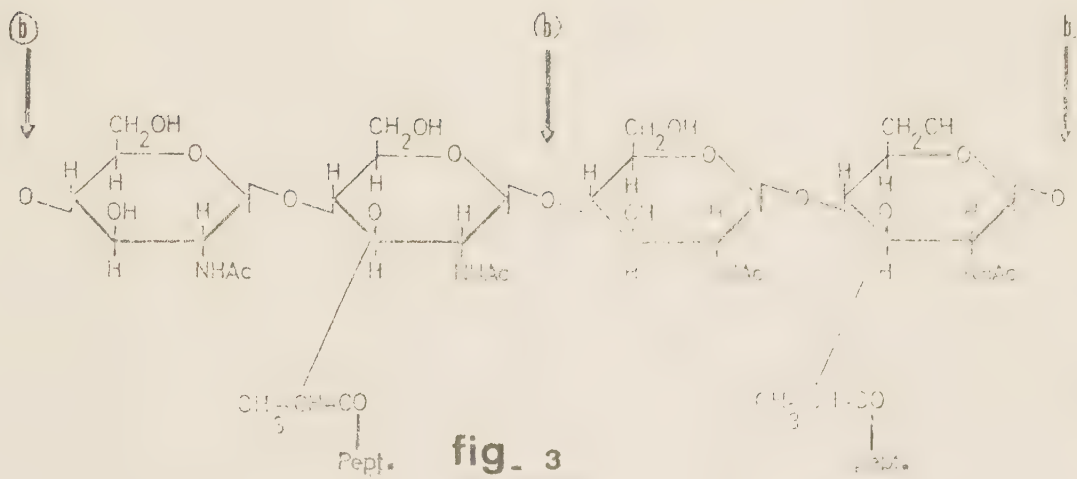
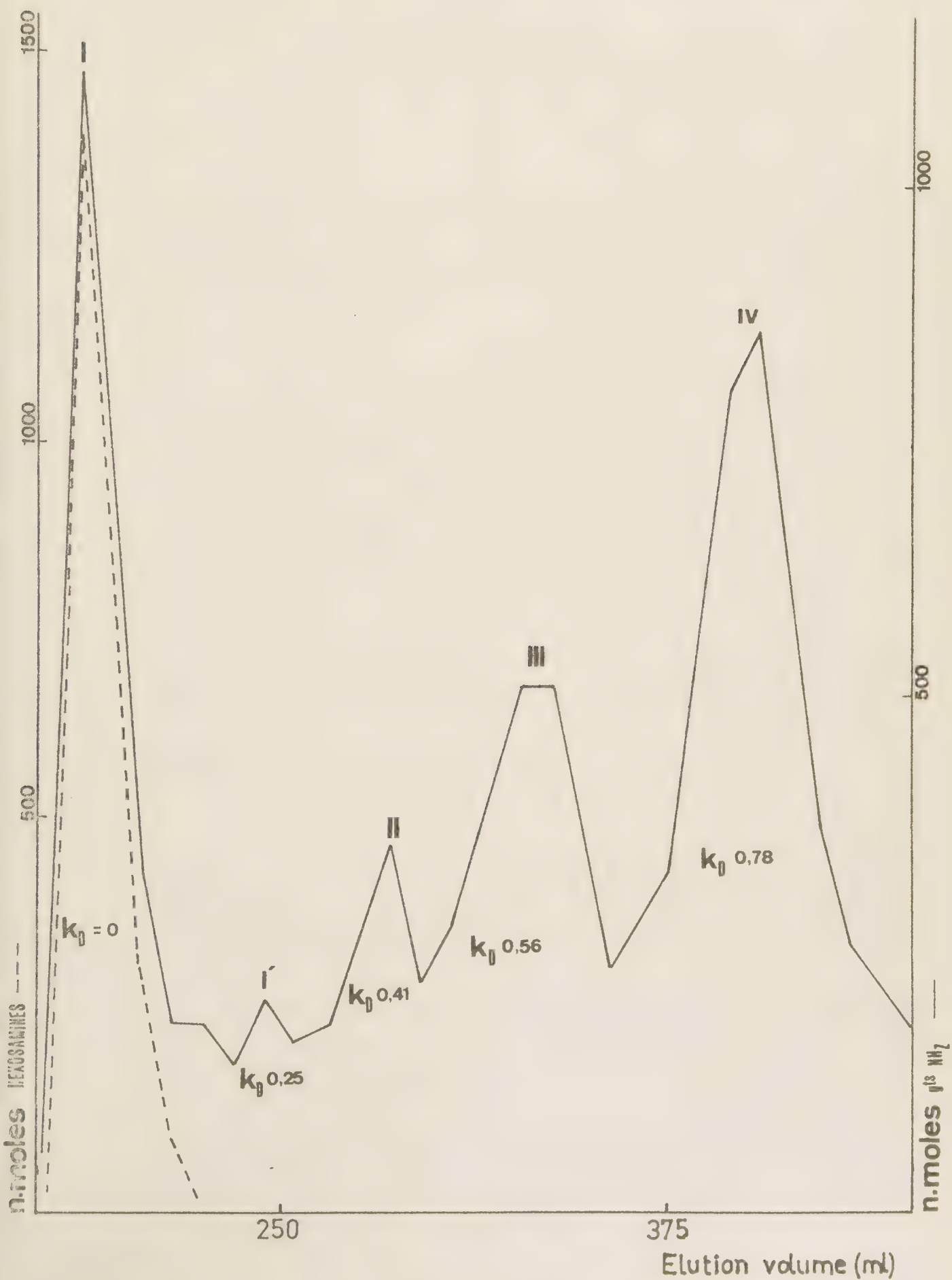


Schéma de l'action du lysozyme sur le peptidoglycane.

fig -4

Fractionnement sur colonne de Sephadex G25 par l'acide acétique 0,1 N des produits d'action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter sur les parois P 2



les résultats. Nous pouvons identifier 5 pics à des K_D différents :

- pic I, $K_D = 0$ qui correspond au polymère
- pic I', $K_D = 0,25$ qui correspond à l'oligomère
- pic II, $K_D = 0,41$ qui correspond au peptide trimère
- pic III, $K_D = 0,56$ représentant le peptide dimère
- pic IV, $K_D = 0,78$, pic du peptide monomère.

Ces composés sont analysés par chromatographie sur couche mince de cellulose dans le solvant butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24) en présence des peptides monomères et dimères témoins isolés de *N.kirovani* (24). Le pourcentage de chacun de ces produits est donné dans le tableau suivant :

TABLEAU II

Pourcentage des différents peptides obtenus par action de l'enzyme AL 1

Peptides	%
Peptide monomères	42,6
Peptides dimères	21,4
Peptides trimères et oligomères	13,6
Polymère	22,3

Ces pourcentages sont estimés d'après les dosages globaux des groupements $-NH_2$ terminaux effectués sur chaque produit de dégradation.

B. Action enzymatique du lysozyme.

Le lysozyme est une enzyme bactériolytique qui dissocie le glycane, il y a apparition de disaccharides et par conséquent de groupements réducteurs au niveau de l'acide muramique. C'est en fait une endo-N-acétylmuramidase qui coupe les liaisons osidiques entre l'acide muramique et la glucosamine (figure 3., p.26).

Les conditions optimales de l'action enzymatique sont déterminées tout d'abord par des micro-essais et la lyse du substrat est appréciée par turbidimétrie à 550 nm et par le calcul du pouvoir réducteur des disaccharides-peptides libérés.

300 mg de parois P_2 sont traités avec 50 mg de lysozyme dans le tampon acétate 0,2 M à pH 5,4 à 37°C pendant 24 heures sous agitation. 40 % des parois ne sont pas dégradées. La partie soluble représente la

partie glucidique sous forme d'unités de disaccharides-peptides. Elle est concentrée sous vide à 37-40°C jusqu'à 1,5 ml puis fractionnée sur une colonne de Séphadex G 50 reliée en série à une colonne de Séphadex G 25. Les deux colonnes sont équilibrées avec une solution de chlorure de lithium 0,1 M ($V_o = 500$ ml, $V_i = 1350$ ml). Le produit est déposé au sommet de la première colonne. L'élution est effectuée avec la même solution de chlorure de lithium. Le débit d'élution est de 40 ml/heure et les fractions sont de 5 ml. Les groupements réducteurs sont dosés par la méthode de Parck et Johnson.

Nous obtenons la courbe d'élution de la figure 5 renfermant 4 pics principaux :

- pic I, $K_D = 0,68$: disaccharide peptide monomère,
- pic II, $K_D = 0,54$: bisdisaccharide peptide dimère,
- pic III, $K_D = 0,40$: oligo-disaccharide peptide oligomère,
- pic IV, $K_D = 0$: poly-disaccharide peptide polymère B

Les fractions correspondant à chacun des pics sont rassemblées, concentrées à 37°C et désalifiées par filtration sur colonne de Séphadex G 25 ($V_o = 80$ ml, $V_i = 180$ ml) avec élution à l'eau (figure 6 p. 31).

C. Obtention du disaccharide.

Les fractions correspondant au pic du polymère A (pic I, fig. 4) obtenu après action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter sur les parois contient un mélange de peptides polymères et de polysaccharides.

En faisant agir le lysozyme sur ce mélange, on coupe le polysaccharide en disaccharides et éventuellement tétrasaccharides.

Le polymère concentré à sec est incubé avec 10 mg de lysozyme dans 24 ml de tampon acétate 0,2 M à pH 5,4. On laisse 24 heures sous agitation à 37°C. La solution est ensuite concentrée à 40°C jusqu'à 2 ml et filtrée sur Sephadex G 25 dans l'acide acétique 0,1 N ($V_o = 130$ ml, $V_i = 650$ ml). Les fractions collectées sont de 5 ml et le débit de 80 ml/h.

Le dosage des groupements réducteurs et des groupements $-NH_2$ terminaux est représenté par la courbe de la figure 7 (p. 32). Les groupements $-NH_2$ et les groupements réducteurs sont exprimés en nmoles/ml. On obtient les pics I et II dont les K_D respectifs sont 0,29 et 0,98. Le pic II est identifié au disaccharide par chromatographie sur papier. Le pic I subit une hydrolyse acide à 110°C pendant 16 heures. La chromatographie sur colonne selon Moore et Stein à l'autoanalyseur Technicon donne un mélange complexe de glucosamine, d'acide muramique dans un rapport équimoléculaire et d'acides aminés : Ala, Glu, DAP, Val, Leu, Gly, Asp, Thr, Ser, Phe en proportions variées. Nous y reviendrons ultérieurement. Le lysozyme a donc scindé le polymère en deux fractions : une fraction peptidoglycanique complexe et un disaccharide.

fig -5

Fractionnement sur colonne de Sephadex
G 50 - G 25 (dans LiCl 0,1 M) des produits
d'hydrolyse des parois P 2 par le lysozyme

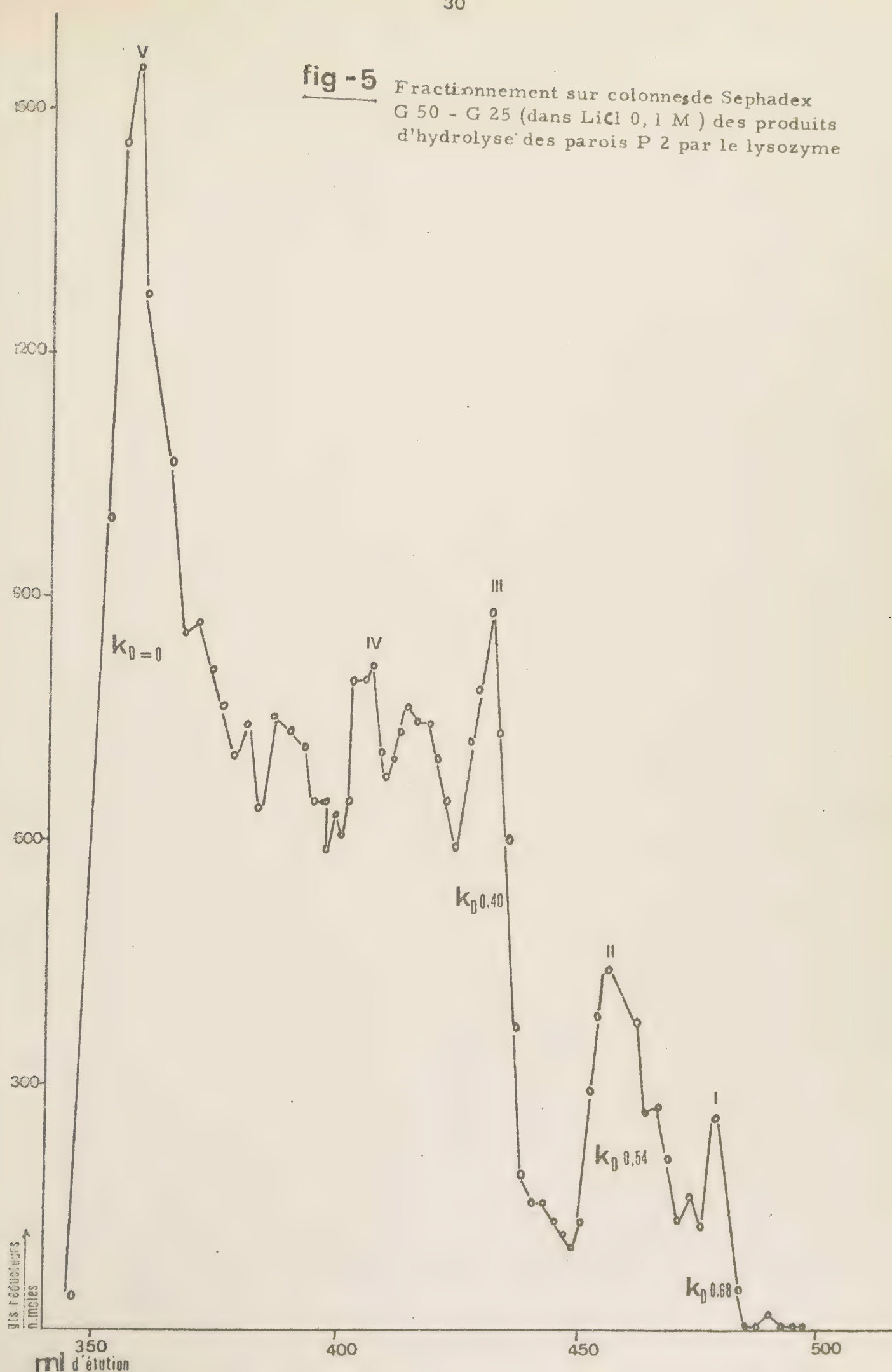


fig-6

Désalification du bis-disaccharide peptide dimère
sur colonne de Sephadex G 25 dans l'eau .

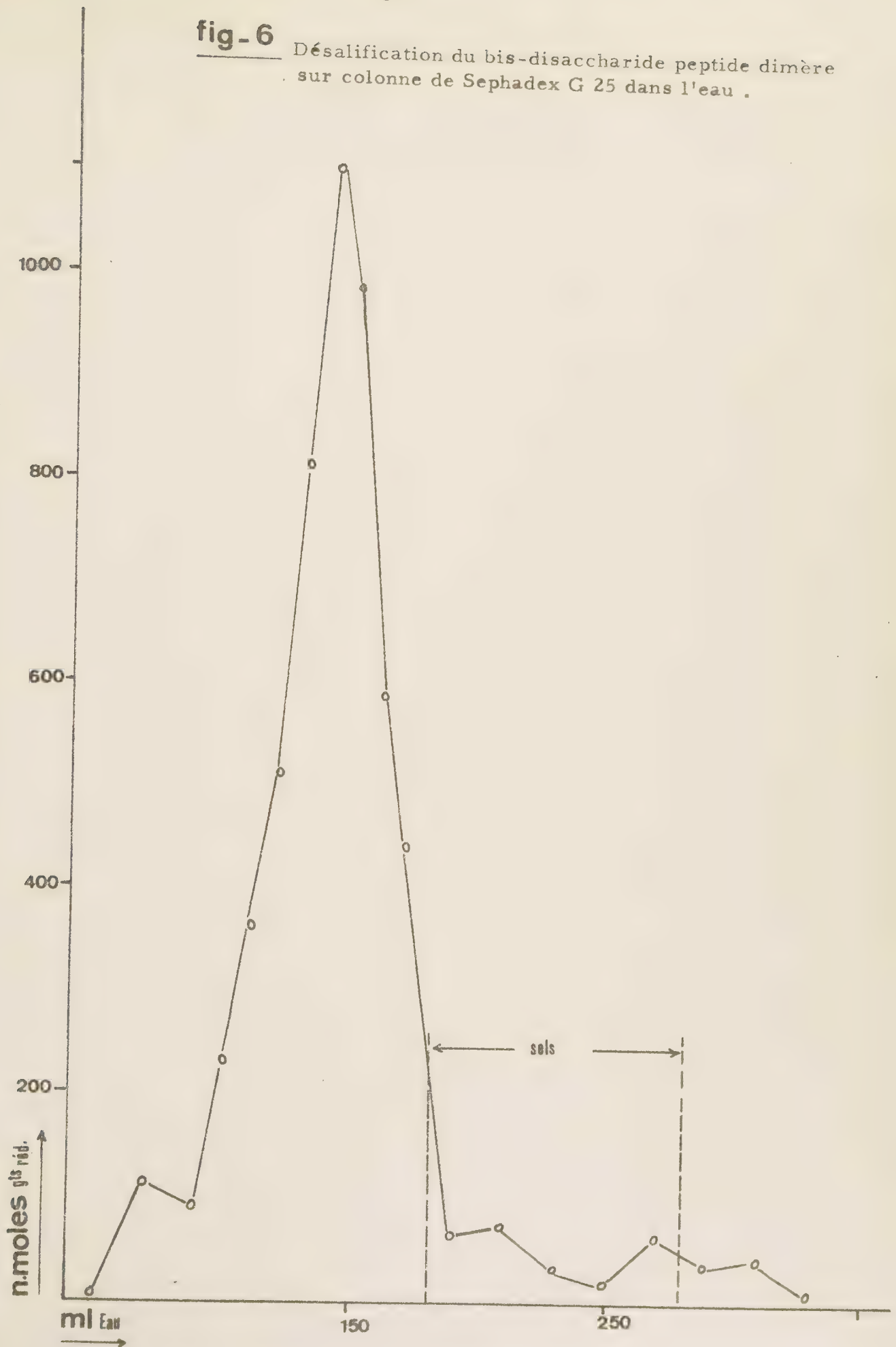
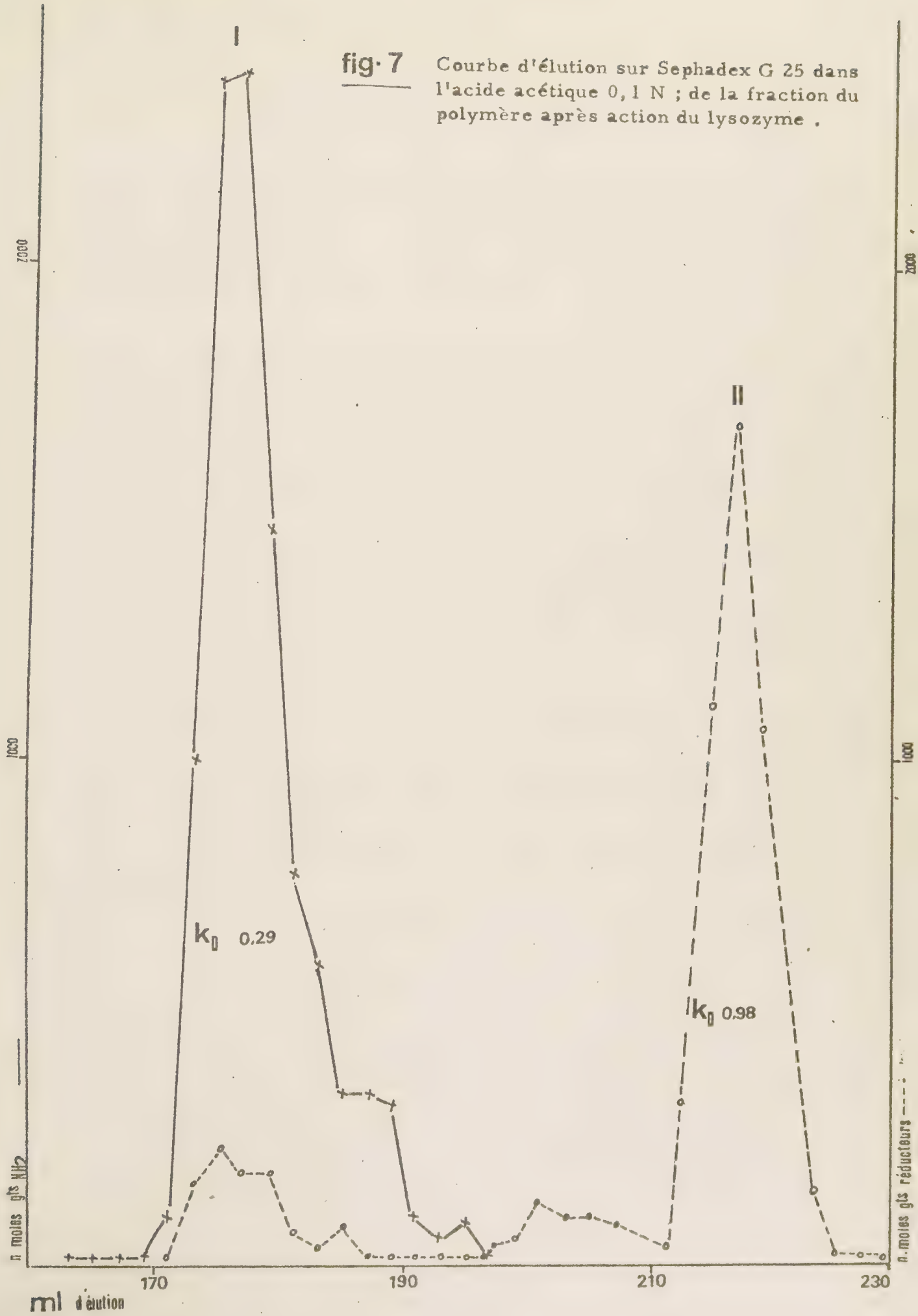


fig. 7

Courbe d'élution sur Sephadex G 25 dans l'acide acétique 0,1 N ; de la fraction du polymère après action du lysozyme .



D. Etude du disaccharide.

Identification du disaccharide par chromatographie sur papier.

Les hexosamines et les oligosaccharides à hexosamines sont décelables sur papier par fluorescence après avoir plongé le chromatogramme dans le réactif de Sharon (47). Ce réactif est spécifique des hexosamines N-acétylées. Il faut noter que l'acide N-glycolylmuramique réagit plus faiblement et donne une tache moins fluorescente que la N-acétylglucosamine révélée dans les mêmes conditions.

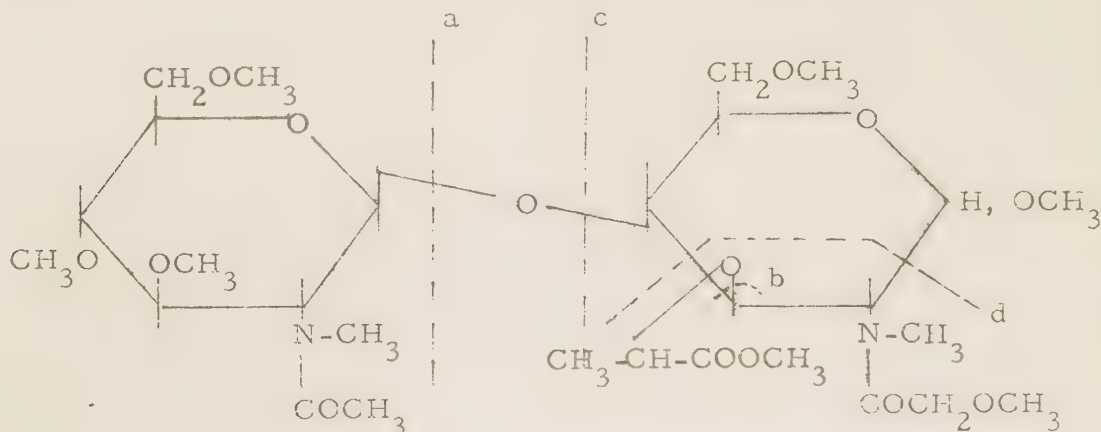
Le disaccharide purifié de *N.caviae* provenant de l'action de l'enzyme AL 1 de *Myxobacter* sur les parois, puis du lysozyme, a été analysé d'abord par chromatographie sur papier Whatman n°1. 50 à 100 nmoles de disaccharide sont déposées par point. 30 nmoles de disaccharide de *N.kirovani* comme témoin N-glycolylé et 15 nmoles de disaccharide de *B.rettgeri* comme témoin N-acétylé. Une prise de 30 nmoles de tétrasaccharide provenant de *N.kirovani* a été également déposée pour vérifier la pureté du disaccharide étudié. Le développement est maintenu dans le solvant butanol-acide acétique-eau (5:1:2). Après révélation par le réactif de Sharon, le chromatogramme montre une tache fluorescente au niveau de celle du disaccharide de *N.kirovani* (N-glycolylé), $R_f = 0,19$ (fig. 8, p. 34). Aucune trace de tétrasaccharide n'a été décelée. La pureté du disaccharide étudié est par conséquent parfaite. Ce résultat est confirmé par la spectrométrie de masse.

Etude du disaccharide par spectrométrie de masse

Le spectre de masse du disaccharide de *N.caviae* a été obtenu avec un spectrographe MS 902 (AEI) après méthylation selon la méthode décrite par Hakomori (43).

La perméthylation a été effectuée sur 3 μ moles de disaccharide. D'après le spectre obtenu (figure 9, p. 35), on peut identifier cinq pics principaux :

- un pic moléculaire à $m/e = 638$ correspondant à la formule :



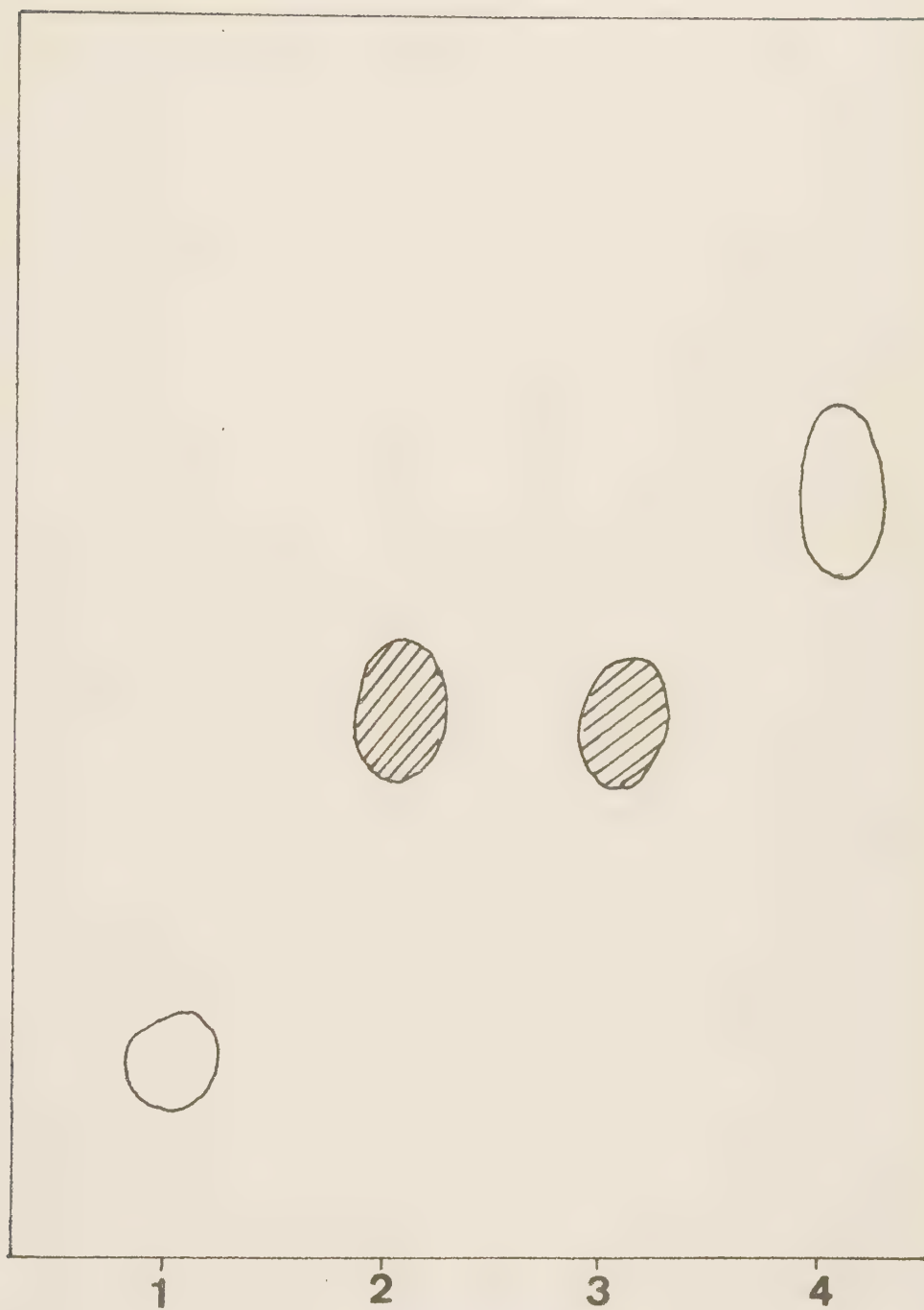


Figure 8 -

- 1-Tétrtrasaccharide de N.kirovani.
- 2-Disaccharide de N.kirovani.
- 3-Disaccharide de N.caviae.
- 4-Disaccharide de B.rettgeri.

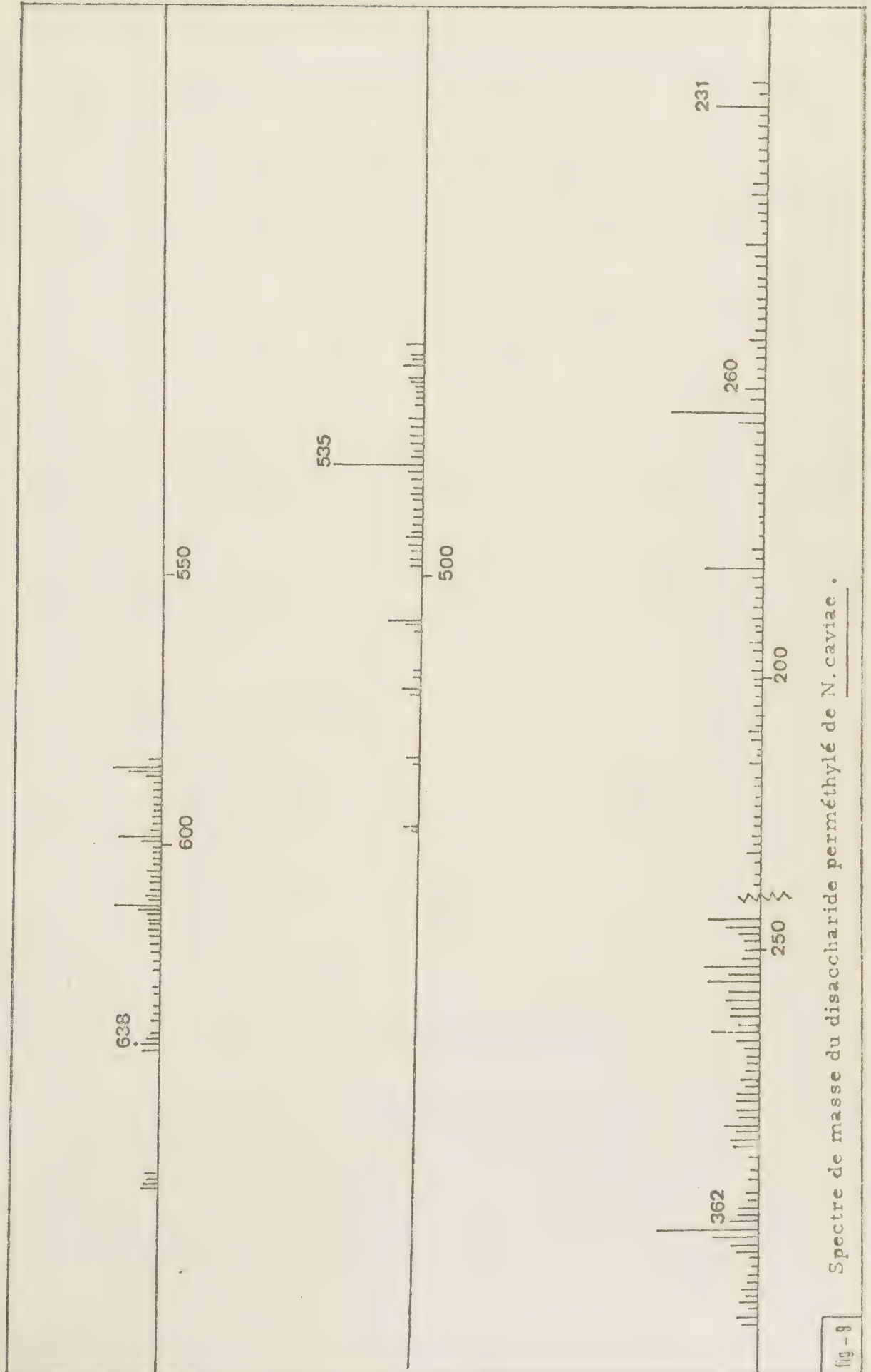


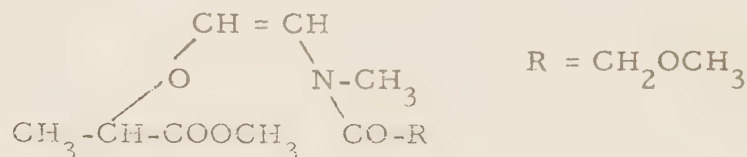
fig - 9 Spectre de masse du disaccharide perméthylé de *N. caviae*.

- un pic à $m/e = 535$ ($M - 103$) selon la coupure b avec perte du fragment lactyle $M - (\text{CH}_3 - \underset{\text{O}}{\underset{|}{\text{CH}}} - \text{COOCH}_3)$.

- un pic à $m/e = 362$ correspondant à la coupure de la liaison osidique selon c.

- un pic à $m/e = 260$ provenant de la coupure selon a.

- un pic à $m/e = 231$ provenant de la coupure selon d et représentant le fragment qui contient les carbones 2 et 3 de l'acide muramique (24)(48) dont la formule est :

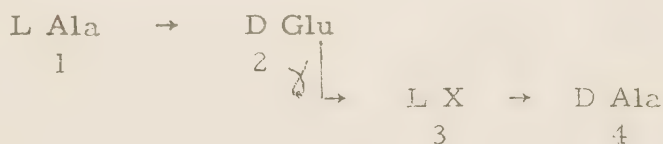


Dans le disaccharide de N. caviae comme dans le spectre du disaccharide de N. kirovani (24), de Mycobacterium smegmatis (49) et de Micromonospora (50) l'azote de C_2 est substitué par un groupement COCH_2OH (groupement glycolyle) au lieu de COCH_3 (groupement acétyle).

En outre les spectres de masse des dérivés perméthylés du disaccharide de N. kirovani et de N. caviae sont parfaitement identiques. Il s'agit donc de l'acide β N-acétylglucosaminyl (1→4) N-glycolylmuramique.

E. Etude du peptide monomère.

La séquence tétrapeptidique des peptidoglycanes bactériens est en général du type :



Dans les parois de N. caviae, l'acide aminé X est meso-DAP. Son identification et son étude viendront en fin de chapitre.

Nous avons obtenu les peptides monomères par action de l'enzyme AL 1 de Myxobacter sur le peptidoglycane purifié et le disaccharide peptide monomère après action du lysozyme sur un autre lot de ces parois (figure 4 pic IV et figure 5 pic I). Dans un premier temps nous avons fait un dosage des acides aminés constituant ce peptide monomère. Le tableau III indique les résultats ainsi que l'analyse des dimères (fig. 4 pic III) et des polymères (fig. 4 pic I).

TABLEAU III

Dosage des acides aminés dans les peptides
Les résultats sont exprimés en rapport molaire pour Glu = 1

	Ala	Glu	DAP	Asp	Thr	Ser	Gly	Val	Leu	% en A.A non constitutifs
Monomères	1,67	1	0,95	0,21	0,14	0,24	0,26	0,13	0,20	25
Dimères	1,26	1	1,04	0,19	0,09	0,13	0,17	0,10	0,15	20
Polymères	1,64	1	0,98	0,77	0,16	0,46	0,54	0,40	0,34	42

On constate une proportion équimoléculaire d'acide glutamique et d'acide diaminopimélique et une quantité d'alanine supérieure (environ 1,5 mole pour 1 mole d'acide glutamique). On remarque dans tous les cas un pourcentage variable d'acides aminés non constitutifs du peptidoglycane.

Les peptide monomère et disaccharide peptide ont été étudiés par chromatographie sur couche mince de cellulose et par électrophorèse. Nous avons également cherché le degré d'amidification du monomère et nous l'avons vérifié par la dégradation d'Edman suivie de l'électrophorèse.

Identification du peptide monomère par chromatographie sur
couche mince.

15 nmoles du peptide monomère de N.caviae sont déposées sur plaque de cellulose. Une quantité aliquote du peptide monomère de N.kirovani sert de témoin. Le solvant utilisé est butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24). Après révélation à la ninhydrine Russel, les peptides monomères donnent deux taches voisines de Rf 0,19 et 0,23. Elles correspondent en effet à un tripeptide et à un tétrapeptide, ce dernier étant plus abondant (figure 10, p.38).

Electrophorèse du peptide monomère.

L'électrophorèse du peptide monomère de N.caviae est effectuée en présence de peptides témoins monoamidé, diamidé et non amidé dans le tampon eau-pyridine-acide acétique (1000:2,5:9), pH 4, 25 V/cm. L'intensité du courant est de 10 mA et la température entre 0 et 3°C.

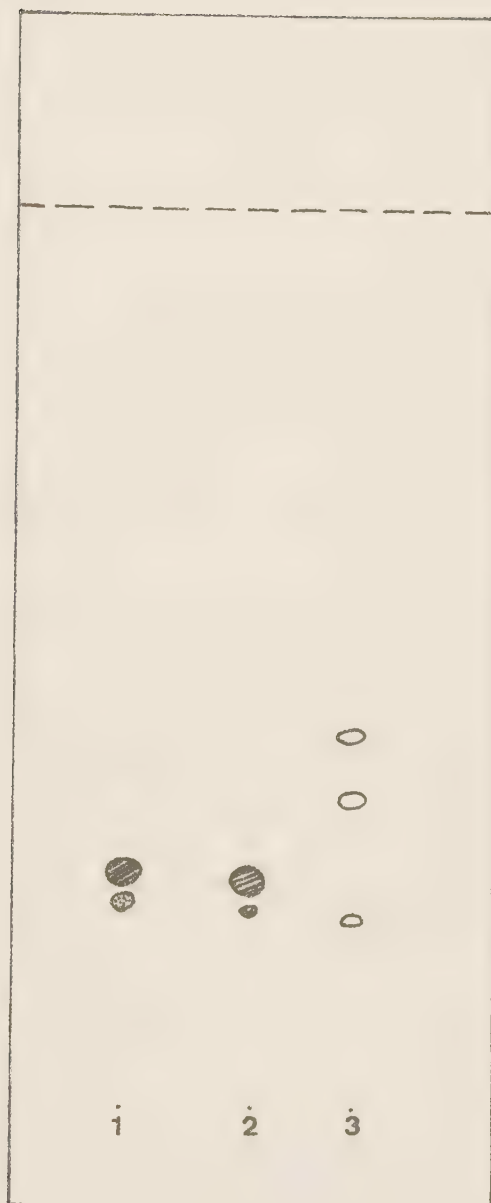


fig. 10

- 1- Peptide monomère de N. caviae .
- 2- Peptide monomère de N. kirovani.
- 3- Témoins d'acides aminés(Ala, Glu, Dap).

Au bout de deux heures et après révélation à la ninhydrine Russel on identifie pour N. caviae une tache principale au niveau du monomère diamidé et une autre tache moins intense au niveau du monomère monoamidé (figure 11 p. 41)

Nous avons pu estimer le pourcentage de ces deux composés par électrophorèse préparative. Deux prises d'essai de 30 et 70 nmoles du monomère de N. caviae sont déposées pour électrophorèse. Une quantité aliquote du monomère de N. kirovani est déposée parallèlement. On révèle à la ninhydrine 0,45 % dans l'acétone et on laisse une heure à 50°C. Les taches révélées sont découpées et éluées par 4 ml du mélange acétone -eau (75:25). Après repos pendant 10 minutes à l'obscurité, la coloration est lue à 570 nm.

Il en résulte que 73 % du peptide monomère est sous forme de peptide diamidé et 27 % sous forme de peptide monoamidé. Les pourcentages sont très voisins de ceux de N. kirovani où l'on trouve respectivement 78 % et 22 % de peptides diamidé et monoamidé.

Cette étude a été confirmée par chromatographie sur résine Aminex du peptide monomère.

Localisation de l'amide sur le monomère dégradé.

30 nmoles de peptide monomère sont soumises à la dégradation d'Edman. Le produit dégradé est étudié par électrophorèse en même temps qu'un échantillon du produit non dégradé. Après révélation à la ninhydrine Russel on s'aperçoit que le produit dégradé donne deux taches : une tache intense qu niveau des peptides monoamidés et une deuxième tache faiblement colorée au niveau des peptides non amidés (figure 12, p. 42). Ceci est expliqué dans le schéma p. 40.

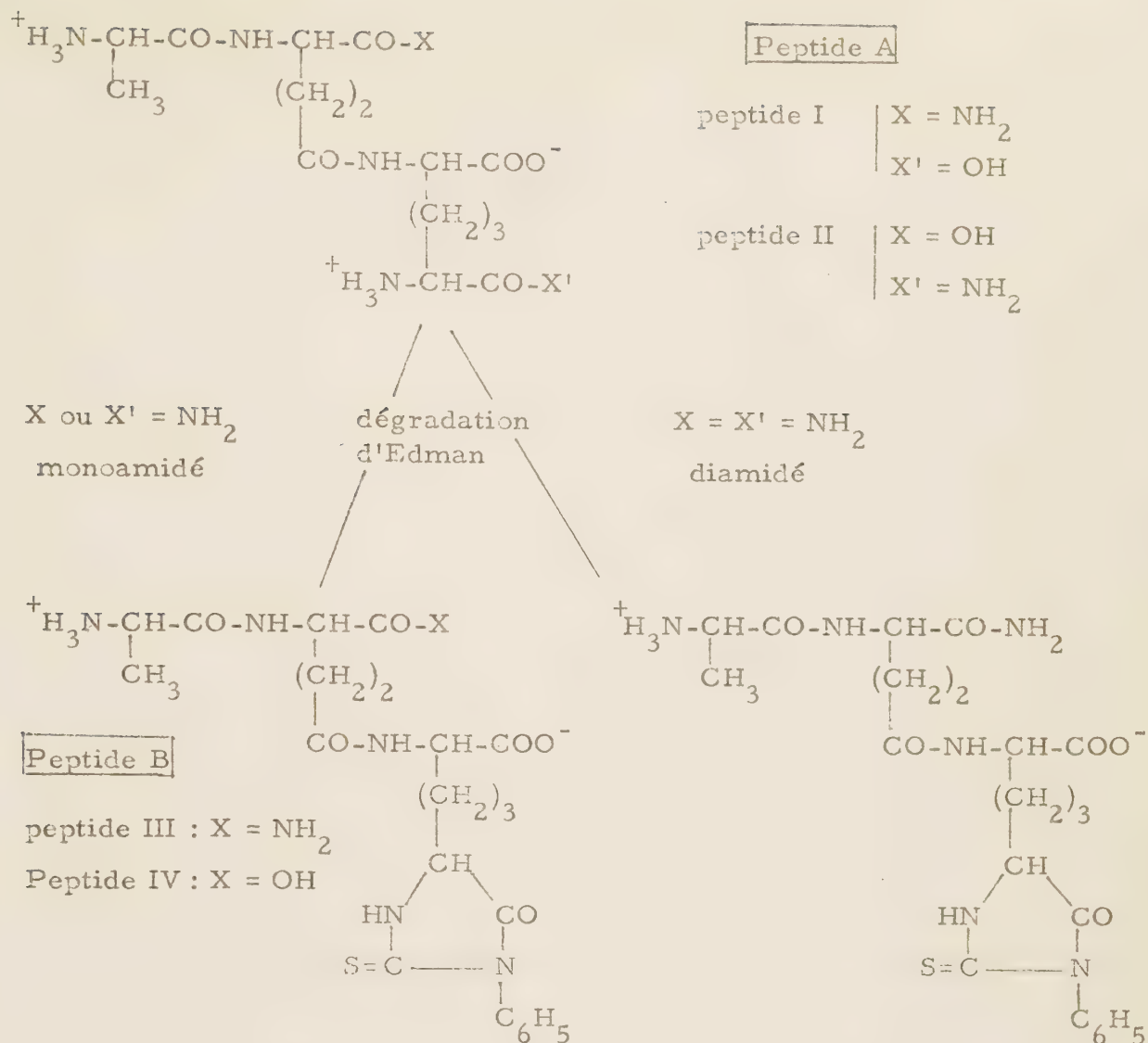
cas du peptide monomère monoamidé sur l'acide glutamique (peptide I)

Après dégradation on obtient le peptide III (1 NH_3^+ , 1 COO^-). Ce nouveau peptide ayant une charge nulle se comporte comme les peptides monoamidés. Sa charge ionique et sa mobilité électrophorétique s'avèrent identiques à celles du peptide monoamidé avant dégradation (2 NH_2 , 2 COOH). Le peptide III est aussi obtenu après la dégradation d'Edman sur le peptide monomère diamidé.

cas du peptide monomère monoamidé sur DAP (peptide II)

Après dégradation d'Edman on obtient le peptide IV (1 NH_3^+ , 2 COO^-). Ce nouveau peptide à charge totale négative se comporte par électrophorèse comme un peptide non amidé et migre vers l'anode.

Le peptide monomère de N. caviae est par conséquent en partie diamidé sur Glu et DAP et en partie monoamidé sur DAP.



Purification du peptide monomère.

La présence des peptides monomères monoamidé et diamidé ainsi que leurs proportions respectives sont confirmées par chromatographie sur colonne de résine Aminex Q 15 S *.

Environ 7 μmoles de peptide monomère sont dissoutes dans 2 ml d'eau distillée ; le pH est ajusté à 2,5 par quelques gouttes d'acide formique. La solution est ensuite déposée sur la colonne équilibrée avec le tampon pyridine-acide acétique pH 3,1, 0,2 M en pyridine. On fait passer 40 ml de ce tampon puis l'élution est continuée par un gradient de pH linéaire avec les tampons : pyridine-acide acétique 0,2 M en pyridine, pH 3,1 et pyridine-acide acétique 2 M en pyridine, pH 5,1. Les fractions recueillies sont de 1 ml ; le débit d'élution de 12 ml/h.

* Je remercie Melle Elisabeth Charveriat pour sa bien aimable collaboration technique.

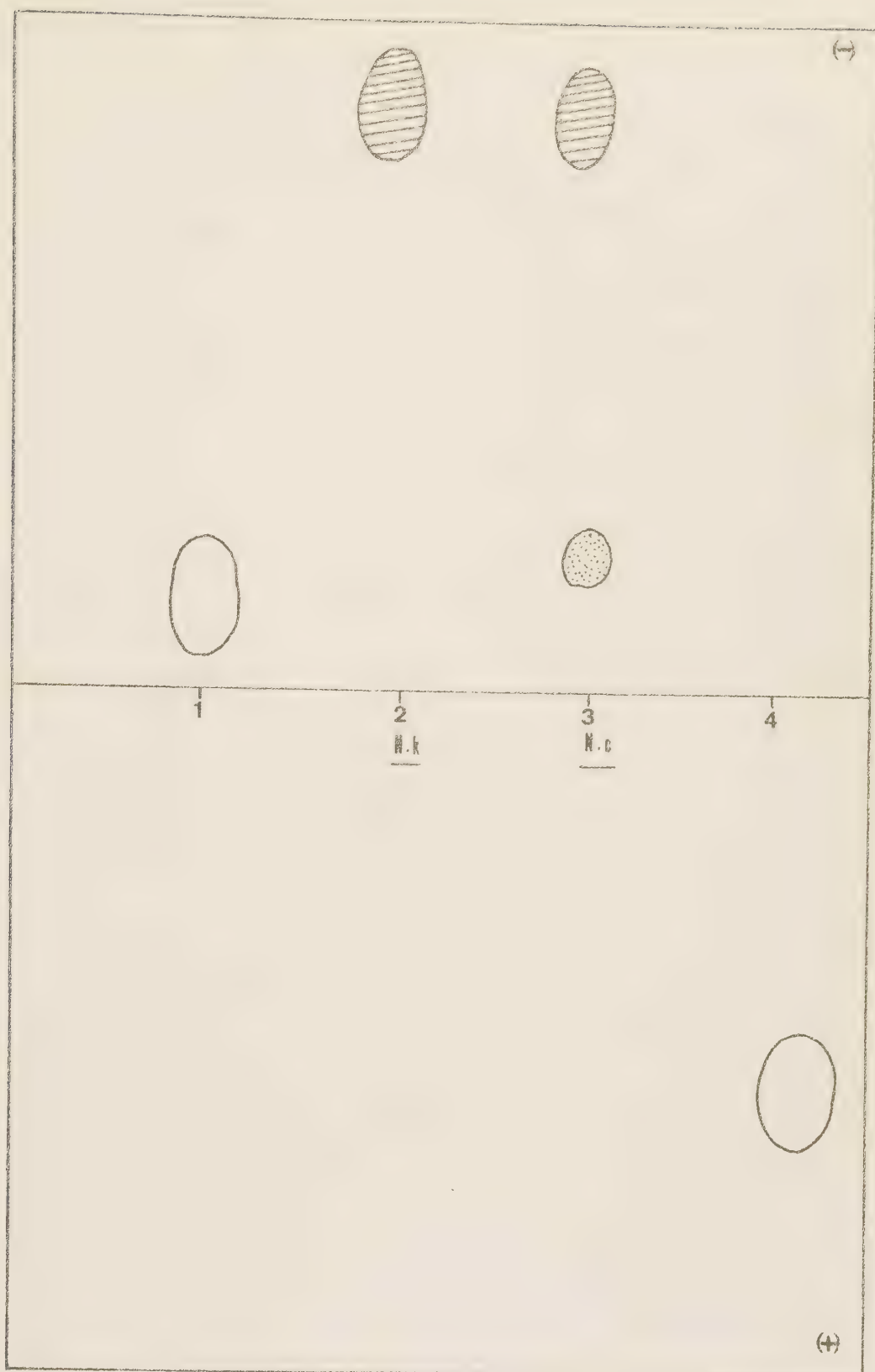


FIGURE : 11

- 1- Peptide monomère de N. piracicabensis. (monoamidé)
- 2- Peptide monomère(diamidé) de N. kirovani.
- 3- Peptide monomère de N. caviae.
- 4- Peptide monomère(nonamidé) de Bacillus megaterium.

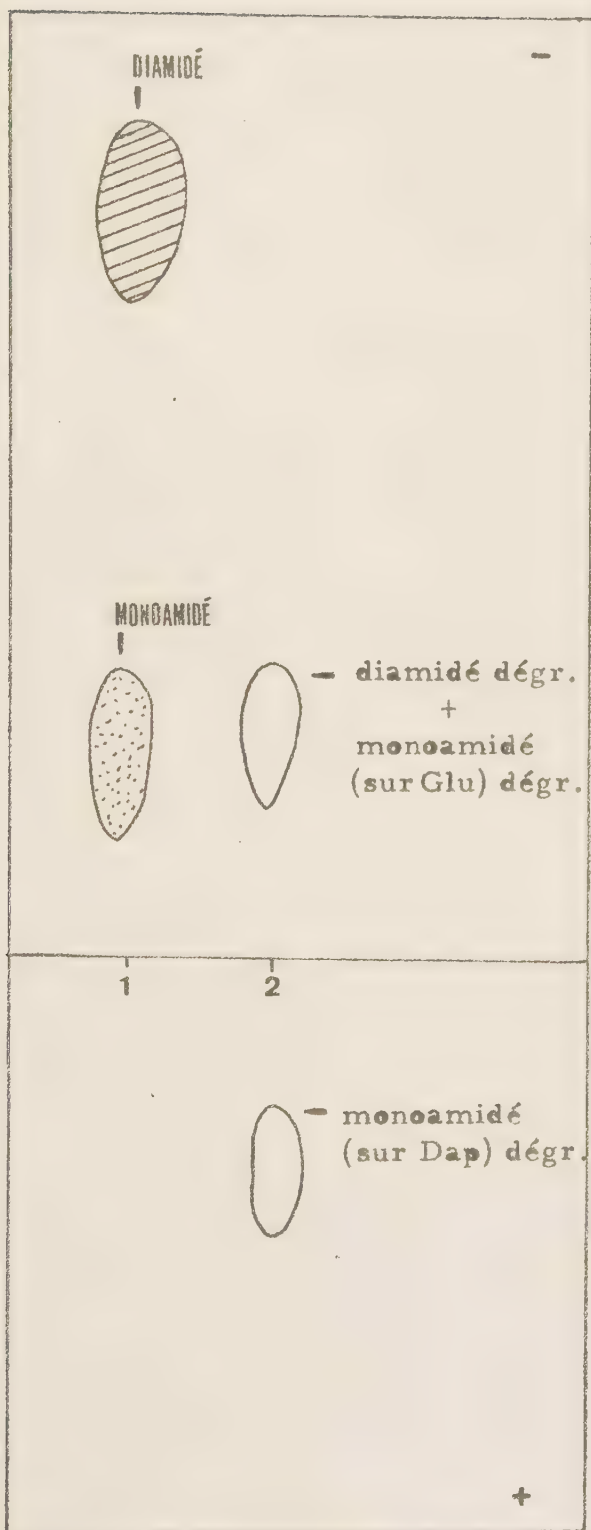


fig-12

1 - Peptide monomère avant
dégradation d'Edman.

2 - peptide monomère après
une dégradation.

Le dosage des aminoacides est fait sur une partie aliquote de chaque fraction de l'éluat après hydrolyse alcaline dans un bain-marie bouillant selon la méthode colorimétrique de Moore et Stein (51). Après avoir dilué chaque essai par 1 ml d'éthanol 50 % la coloration est lue à 570 nm. Un dosage parallèle d'un témoin, l'alanine, est effectué dans les mêmes conditions. La courbe obtenue est indiquée figure 13 p. 44. On peut y voir deux pics principaux I et II et deux autres moins importants a et b. Les fractions correspondant à chaque pic sont rassemblées et désalifiées sur colonne de Dowex 2 X 8 avec élution par l'acide acétique N.

Après hydrolyse acide des fractions I, II et b par HCl 6 N à 120° pendant une nuit, les acides aminés sont analysés par chromatographie sur couche mince et sur colonne (Technicon). On trouve seulement les acides aminés Ala, Glu, DAP dans les proportions indiquées tableau IV.

TABLEAU IV

Dosage des acides aminés des peptides I, II, b (fig.13)

Les résultats sont exprimés en rapport molaire par rapport à DAP = 1

Peptide	Ala	Glu	DAP
I	1,83	0,90	1
II	1,9	0,94	1
b	1,08	0,84	1

On remarque d'après le tableau que Ala, Glu, DAP dans I et II sont dans les rapports (2:1:1). Il s'agit donc de tétrapeptides. L'analyse de b donne Ala, Glu, DAP dans des proportions équimoléculaires : c'est un tripeptide.

Le degré d'amidification de chacun de ces peptides a été vérifié par électrophorèse (figure 14, p. 45). Chacun de ces peptides donne une seule tache révélée à la ninhydrine Russel. Les mobilités électrophorétiques des peptides sont en faveur d'une diamidation pour II et b sur les COOH de Glu et de DAP non engagés dans les liaisons peptidiques ; et une monoamidation pour I et a. Nous avons montré précédemment que dans ce cas le groupement amide était fixé sur DAP.

Les peptides diamidés II et b représentent 72 % des peptides totaux du monomère.

fig. 13

Fractionnement des peptides monomères sur colonne
Aminex de résine cationique.

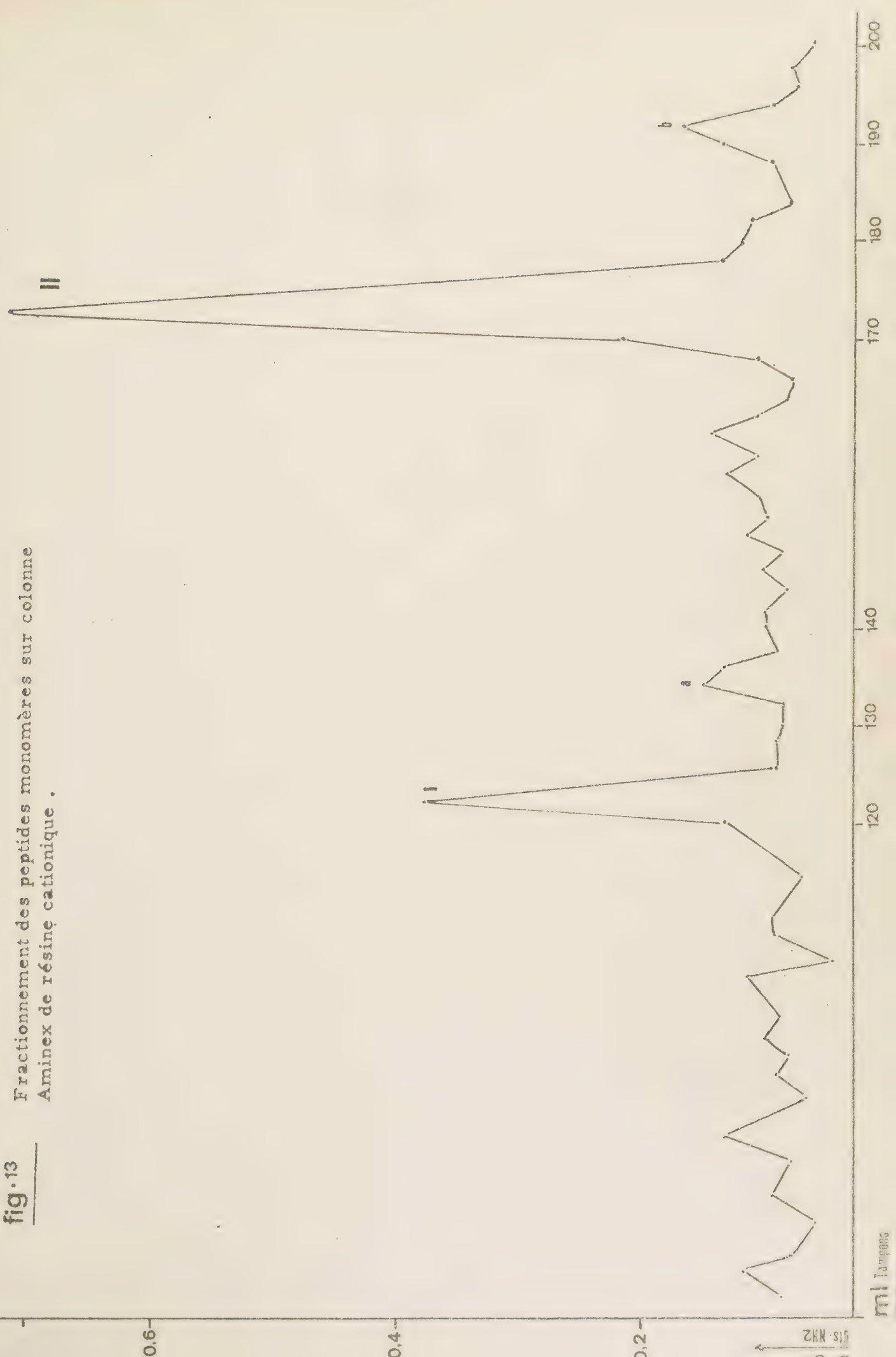


fig. 14

- 1-Tétrapeptide monoamidé de N. kirovani.
- 3-Tripeptide monoamidé de N. kirovani.
- 5-Tétrapeptide diamidé de N. kirovani.
- 7-Tripeptide diamidé de N. kirovani.



1	2	3	4	5	6	7	8	+
N.k	N. caviae	N.k	N. caviae	N.k	N. caviae	N.k	N. caviae	
	I		a		II		b	

Ainsi, le pic I, volume d'élution 120 ml, correspond au tétrapeptide monoamidé ; le pic II, le plus important, volume d'élution 170 ml, représente le tétrapeptide diamidé. Les deux autres pics a et b ont des volumes d'élution respectifs de 134 ml et 190 ml et correspondent aux tripeptide monoamidé et tripeptide diamidé.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux qui ont été obtenus avec les peptides monomères de N.kirovani chromatographiés sur une autre résine (24).

F. Etude du bis-disaccharide peptide dimère.

Le bis-disaccharide peptide dimère est obtenu après fractionnement sur colonnes couplées de Sephadex G 50 et G 25 des produits de dégradation des parois P_2 traitées par le lysozyme (figure 5, pic II, $K_D = 0,54$).

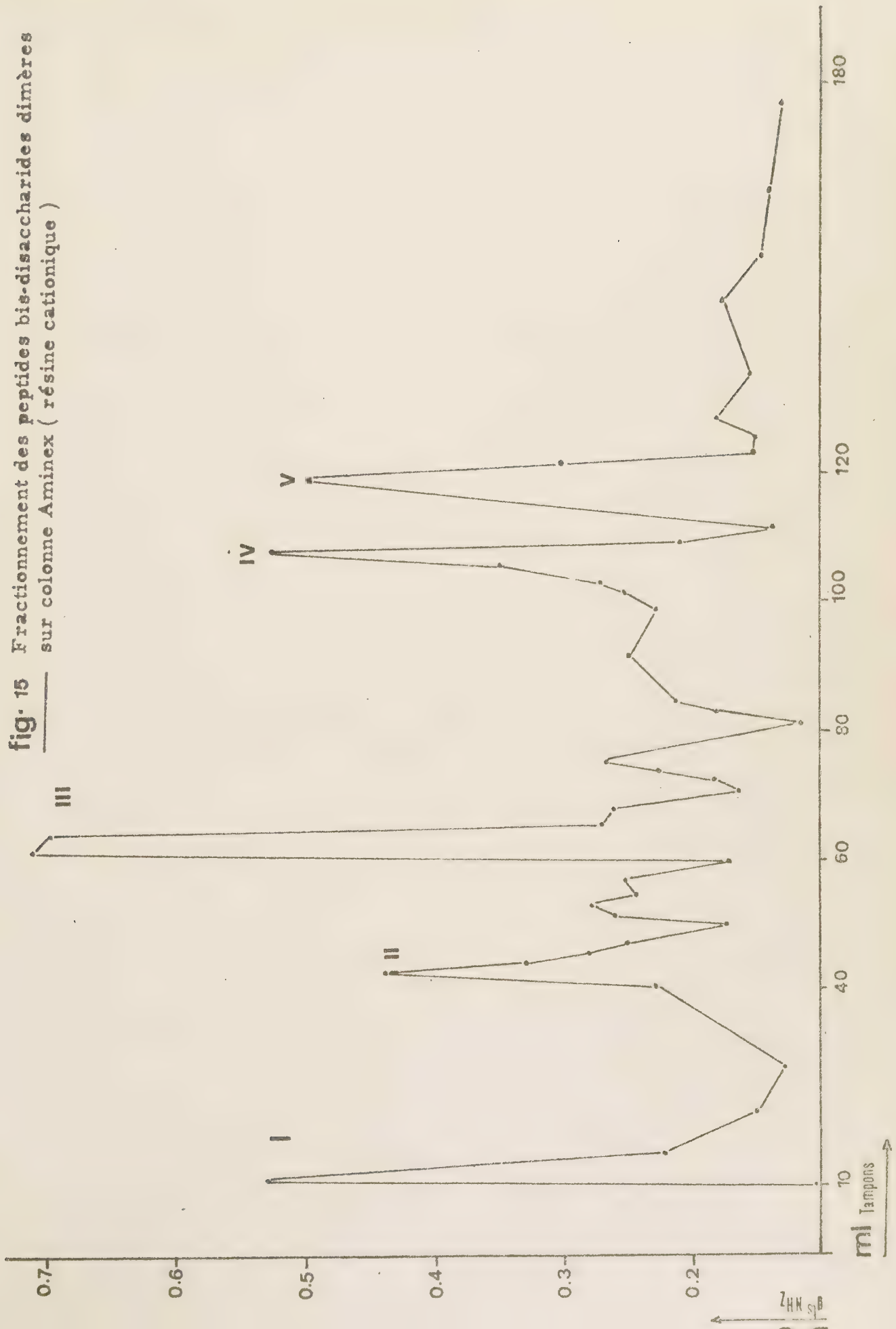
Après désalification, le bis-disaccharide peptide dimère est concentré jusqu'à un volume de 2 ml. Il est ensuite fractionné sur colonne de résine cationique Aminex Q 15 S selon les conditions opératoires utilisées pour la purification du peptide monomère. La courbe d'élution est représentée figure 15 p. 47. On observe cinq pics principaux :

- pic I, volume d'élution 10 ml
- pic II, volume d'élution 40 ml
- pic III, volume d'élution 60 ml
- pic IV, volume d'élution 100 ml
- pic V, volume d'élution 112 ml.

Les fractions isolées après passage sur résine sont concentrées à sec sous vide à 37°C puis chromatographiées sur couche mince de poudre de cellulose dans le solvant butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24) en présence de disaccharide peptide monomère et de bis-disaccharide peptide dimère de Nocardia kirovani utilisés comme témoins. La figure 16 p. 48 montre les résultats obtenus : les taches correspondant aux fractions II et IV ont des R_f identiques ($R_f = 0,23$) alors que les fractions III et V ont un R_f légèrement supérieur ($R_f = 0,25$).

Par analogie avec les résultats obtenus avec les peptides monomères (fig. 10 p. 38), on peut considérer que les fractions II et IV sont des bis-disaccharides octapeptides et les fractions III et V des bis-disaccharides heptapeptides. Ils se différencient d'autre part par leur degré d'amidification, le volume d'élution étant d'autant plus important que l'amidification est plus forte.

fig. 15 Fractionnement des peptides bis-disaccharides dimères
sur colonne Aminex (résine cationique)



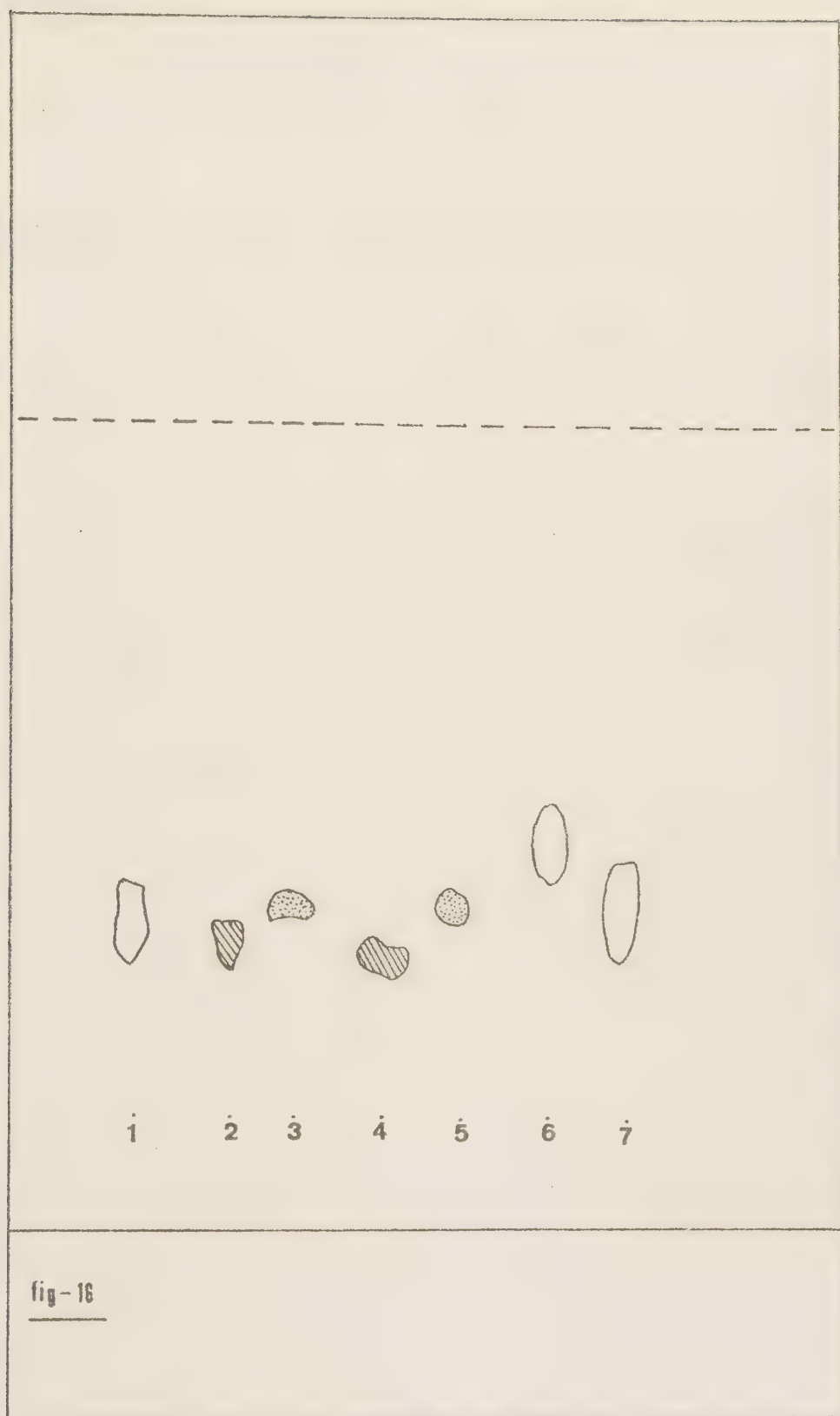


fig-16

1- pic I

2- pic II

3- pic III

4- pic IV

5- pic V

6- Disaccharide peptide monomère de N.kirovani.

7- bis- disaccharide peptide dimère de N.kirovani.

EXPERIENCES DIVERSES

Identification et séparation chromatographique des stéréoisomères de l'acide diaminopimélique.

Nous avons déterminé la configuration optique de l'acide diaminopimélique des parois de *N. caviae* par chromatographie sur papier.

1. Séparation du LL-DAP de meso et DD-DAP (52)

Après hydrolyse acide des parois pures à 110°C, les isomères meso et DD-DAP sont séparés de LL-DAP par chromatographie sur papier Whatman n°1 dans le solvant méthanol-pyridine-HCl 10 N-eau (80:10:2,5:17,5). Le chromatogramme est révélé à la ninhydrine Russel. Dans ce solvant l'isomère LL a un R_f plus grand que les isomères meso et DD qui ne sont pas séparés. On constate que les parois de *N. caviae* ne renferment pas d'isomère LL (figure 17 a, p. 50).

2. Séparation de meso-DAP et DD-DAP (53)

Les isomères DD et meso-DAP sont séparés après dinitrophénylation par chromatographie des DNP dérivés sur papier Whatman n° 3 MM imprégné de tampon phtalate 0,1 M pH 6. Le développement s'effectue dans le solvant alcool amylique tertiaire saturé de tampon phtalate : 100 ml d'alcool amylique tertiaire + 50 ml de tampon phtalate, la phase supérieure sert au développement du chromatogramme.

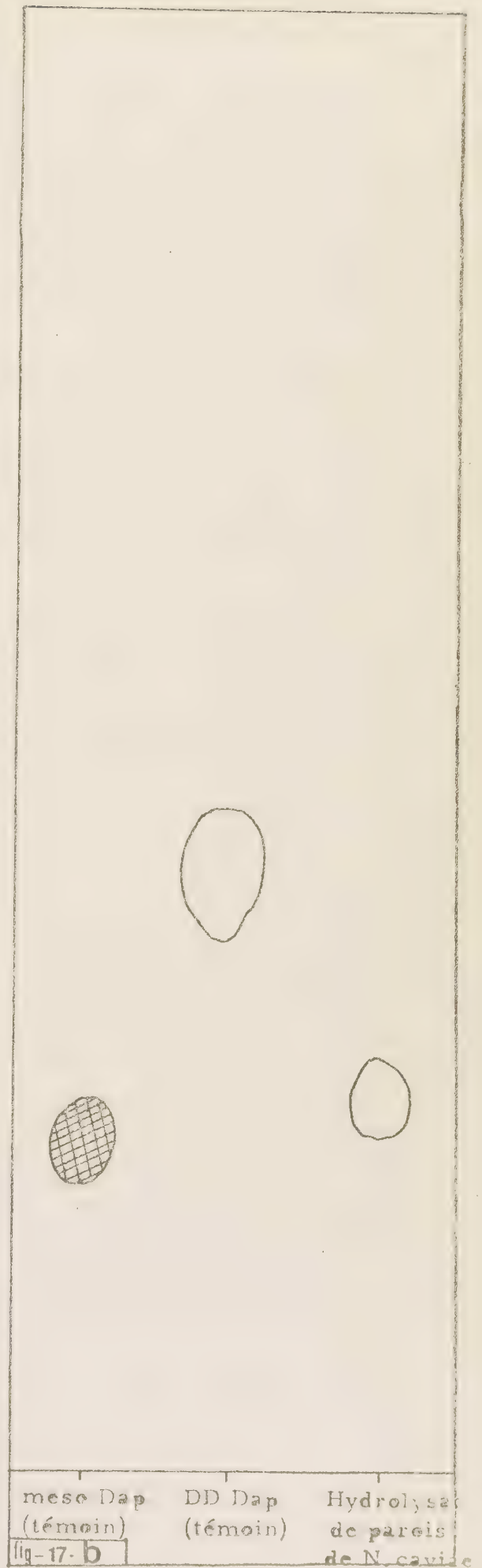
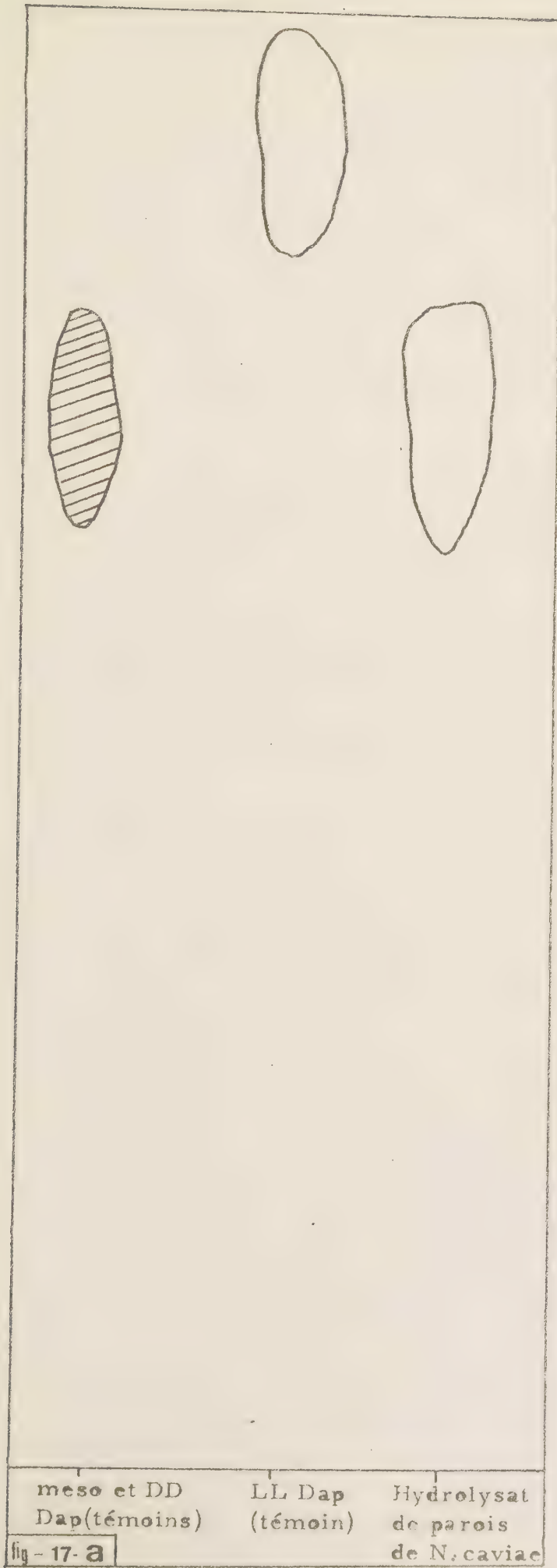
3. Préparation du DNP-meso-DAP.

L'échantillon renfermant 25 à 50 µéquivalents de DAP est dissous dans 100 µl d'eau, on lui ajoute 25 µl d'une solution de tétraborate de potassium 5 % (pH 9,2) et 10 µl d'une solution de DNFB 0,1 M dans l'alcool. Après 30 minutes à 60°C à l'obscurité, 125 µl de HCl 12 N sont ajoutés. On agite et on extrait 3 fois à l'éther. On reprend la phase étherée et on l'évapore à sec.

Pour la chromatographie du produit dinitrophénylé, on le reprend par 50 µl de méthanol et on laisse migrer le solvant à l'obscurité pendant 50 heures.

Deux essais sur DD-DAP et meso-DAP témoins sont effectués dans les mêmes conditions. Les dérivés DNP de l'acide diaminopimélique sont directement repérables grâce à leur coloration jaune.

Le dérivé dinitrophénylé de l'acide diaminopimélique des parois de *N. caviae* possède le même R_f que celui du meso-DAP témoin (fig. 17 b, p. 50).



Identification des sucres neutres dans les parois (54)

Environ 1 mg de parois pures P_1 est hydrolysé par HCl N à 100°C pendant 16 heures. L'hydrolysat est amené à sec sous vide et en présence de P_2O_5 et de NaOH en pastilles, puis repris par 20 µl d'eau distillée. Un dixième de la solution aqueuse de l'hydrolysat est chromatographié sur plaque de gel de silice G imprégné de NaH_2PO_4 0,2 M dans le solvant butanol-acétone-eau (4:5:1). Après développement et séchage à température ordinaire, les sucres sont révélés avec une solution fraîche de naphtorésorcinol dans l'alcool en milieu acide sulfurique. Après quelques minutes à température ambiante on observe des taches bleues sur fond blanc.

Des quantités connues de glucose, d'arabinose et de galactose sont chromatographiées parallèlement dans les mêmes conditions.

Deux taches principales de Rf respectifs 0,38 et 0,20 sont présentes dans les hydrolysats : l'arabinose et le galactose.

Par ailleurs cette analyse qualitative qui a été menée sur les parois après traitement par HCl 0,1 N à 60° (parois P_2) ne montre aucune trace de sucres neutres.

La présence de sucres neutres : arabinose et galactose a été également décelée dans les parois de N. kirovani (24). Ils semblent exister sous forme d'arabinogalactane estérifié par l'acide nocardique. En effet, Lanéelle et Asselineau (55) ont isolé des nocardates d'arabinose à partir des lipides liés de Nocardia brasiliensis.

Identification de l'acide nocardique dans les parois de N. caviae.

Après extraction des parois par éthanol-éther (1:1), l'extrait éthero-alcoolique est saponifié par la potasse méthanolique 5 % pendant 2 heures à 100°C. La partie lipidique est séparée après acidification de l'extrait et extraction à l'éther ; l'éther est repris par une solution aqueuse de soude à 1 %. La phase aqueuse est ensuite acidifiée et les acides sont extraits à l'éther et estérifiés par le diazométhane (56). Les esters nocardiques et les esters non-hydroxylés sont séparés et identifiés par chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le solvant hexane-éther (80:20) et révélés à la rhodamine B et à la 2'7'dichlorofluorescéine. Leurs Rf respectifs sont 0,48 et 0,86. Dans le cas de N. caviae, les acides nocardiques isolés à partir des lipides pariétaux ainsi que ceux isolés des lipides bacillaires * (57) s'avèrent parfaitement identiques. Ces acides nocardiques pariétaux doivent vraisemblablement estérifier un arabinogalactane, la présence d'arabinose et de galactose étant démontrée dans les parois de N. caviae.

* Je remercie Madame M.T. Pommier qui m'a fourni l'acide nocardique témoin.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA PARTIE PEPTIDIQUE DU POLYMERE

Acharya et Goldman (58) ont signalé en 1970 la présence dans les parois de Mycobacterium tuberculosis des acides aminés Gly et Asp en mélange avec les acides aminés constitutifs du peptidoglycane, avec en plus faible quantité d'autres acides aminés : Thr, Ser, Val, Phe. La présence de ces mêmes acides aminés a été signalée à plusieurs reprises dans les parois des Nocardia (59)(60)(61). La question a été discutée de savoir s'ils étaient des contaminants provenant de fragments membranaires ou s'ils appartenaient réellement à la paroi cellulaire.

Récemment, plusieurs acides aminés : Gly, Asp, Thr, Ser et Leu essentiellement, ont été signalés dans les parois de N.kirovani (24)(62) et de N.rubra (63).

L'analyse quantitative des aminoacides dans les parois à différents stades de purification a conduit Beaman et coll. (63) à admettre qu'il existait une fraction peptidique associée à la fraction lipidique de N.rubra.

Nous avons recherché systématiquement la présence des acides aminés non-constitutifs du peptidoglycane dans plusieurs espèces de Nocardia en préparant les parois par la méthode de Parck et Hancock (32). Toutes les espèces étudiées : N.asteroides ATCC 9969, N.brasiliensis ATCC 733, N.farcinica IM 1377, N.erythropolis A 4, N.caviae IM 1381 renferment à côté de Ala, Glu, DAP, constituants du peptidoglycane, d'autres acides aminés en quantités variables. Ils sont particulièrement abondants dans Nocardia caviae et la paroi de cette souche, comme nous venons de l'exposer, a été plus complètement étudiée.

La composition des parois en acides aminés a été déterminée après hydrolyse chlorhydrique par dosage à l'autoanalyseur Technicon. Cette analyse effectuée à différents stades de purification a donné les résultats indiqués dans le tableau V p. 54.

D'autre part, lors du fractionnement de la partie solubilisée par l'enzyme AL 1 de Myxobacter sur Sephadex G 25 nous avons obtenu la courbe d'élution représentée figure 3 page 27. Une partie importante est exclue du gel à $K_D = 0$: c'est une fraction de polymères (pic I). Cette fraction analysée, après hydrolyse acide, à l'autoanalyseur Technicon permet d'observer un enrichissement relatif en acides aminés non constitutifs du peptidoglycane en mélange avec Ala, Glu, DAP (tableau V). Ce polymère traité par le lysozyme et passé sur colonne de Sephadex G 25 dans l'acide acétique 0,1 N libre le disaccharide de la chaîne glycanique (fig. 7 pic II, page 32) et une fraction $K_D = 0$ constituée d'un mélange de polymères peptidiques et peptidoglycaniques (fig. 7 pic I).

Nous avons purifié cette fraction par passage sur colonne de Sephadex G 50 dans l'eau distillée. Le produit est élué par l'acide acétique 0,1 N ($V_0 = 150$ ml, $V_i = 650$ ml), débit de la colonne 80 ml/heure ; les fractions collectées sont de 5 ml.

Après dosage des $-NH_2$ terminaux et des hexosamines, on obtient un pic de polymère peptidique à $K_D = 0,44$ séparé du pic de polymère glycanique $K_D = 0,55$ (figure 18, page 55). Le dosage des aminoacides de ce polymère peptidique a donné les résultats indiqués dans le tableau V.

TABEAU V

Composition en acides aminés des parois de *N.caviae* après divers traitements hydrolytiques et des polymères provenant de l'hydrolyse enzymatique du peptidoglycane *.

Acides aminés	Parois P ₁	Parois P ₂	P ₁ + trypsine	P ₁ + trypsine + pronase	P ₂ + traitement alcalin	Peptide polymère fig.4picI	Peptide polymère fig.8picI
Asp	0.12	0.08	0.09	0.10	0.43	0.77	1.8
Thr	0.08	0.08	0.07	0.12	0.20	0.16	0.5
Ser	0.21	0.14	0.17	0.12	0.26	0.46	0.62
Glu	1	1	1	1	1	1	1
Gly	0.13	0.11	0.15	0.14	0.31	0.54	1.06
Ala	1.99	1.8	1.6	1.5	1.1	1.64	1.9
Val	0.04	0.05	0.10	0.09	0.30	0.40	0.47
Leu	0.13	0.1	0.09	0.10	0.28	0.34	0.72
Phe	0.03	0.05	0.02	0.03	0.09	0.13	0.20
DAP **	1.05	0.9	0.86	0.76	0.56	0.98	1.09

* Exprimée en rapport molaire avec Glu = 1

** DAP = acide diaminopimélique

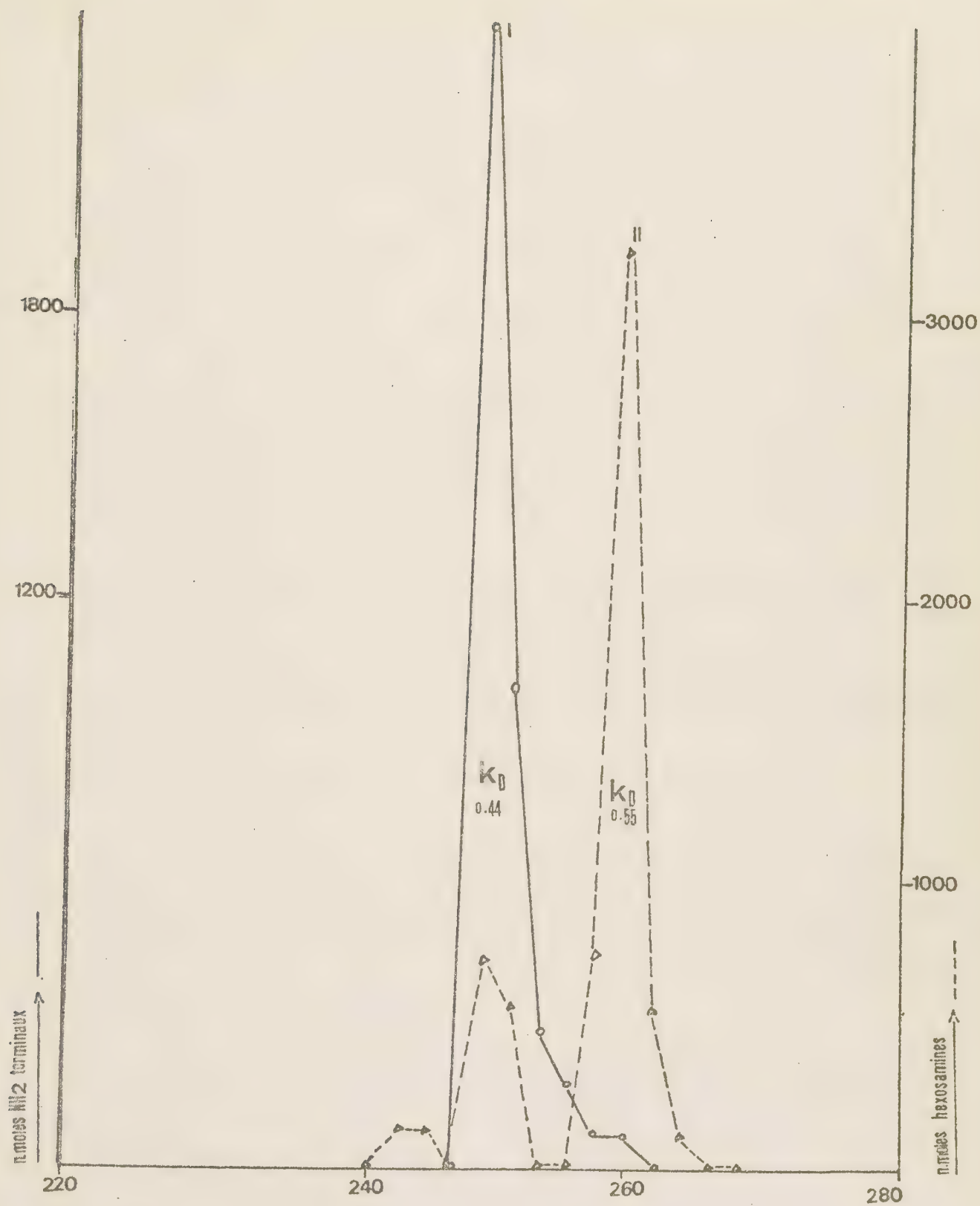


fig. 18 Courbe d'élution sur Sephadex G 50 (élution par l'acide acétique 0,1 N)
de la fraction polymère .

L'examen de ce tableau permet un certain nombre d'observations :

- Les acides aminés non constitutifs du peptidoglycane sont en nombre assez limité, seuls Asp, Thr, Ser, Gly, Val, Leu existent en quantité appréciable avec en proportion plus faible la phénylalanine. Il semble donc exclu qu'ils puissent appartenir à des fractions protéiques membranaires qui auraient accompagné les parois au cours de la préparation. Le traitement à la trypsine suivi ou non d'un traitement à la pronase n'apporte pas de modifications sensibles dans la composition contrairement à ce qui a été observé par Fleck et Mock (64) lors de la purification du peptidoglycane d'une bactérie à Gram-positif Proteus vulgaris P 18. Par contre, après traitement alcalin, on note une nette augmentation des acides aminés non constitutifs du peptidoglycane.

- Les mêmes acides aminés se retrouvent dans la fraction peptidoglycanique solubilisée par traitement à l'enzyme AL 1 de Myxobacter suivi de l'action du lysozyme et plus précisément dans le pic correspondant aux polymères après passage sur Sephadex G 25 (fig. 7 pic I). La purification par une nouvelle filtration sur Sephadex G 50 entraîne un enrichissement important en Asp, Thr, Ser, Gly, Val, Leu et dans une plus faible proportion Phe.

Il est vraisemblable qu'une fraction peptidique ou protéique qui se retrouve dans le polymère après action des enzymes de Myxobacter et du lysozyme existe sous forme liée au peptidoglycane.

Nous avons dans un premier temps étudié cette fraction peptidique ou protéique du polymère par hydrolyse acide ménagée et isolé par chromatographie sur papier des oligopeptides.

Isolement de peptides par hydrolyse ménagée du polymère.

3 μ moles environ du polymère purifié (fraction I, fig. 18) sont soumises à une hydrolyse acide partielle. Nous avons utilisé l'acide chlorhydrique 4 N à 100° pendant 40 minutes (65). L'hydrolysate est amené à sec sous vide en présence de pastilles de soude et de P_2O_5 . Le résidu est dissous dans une quantité d'eau connue et la fraction est prête à l'étude.

A. Chromatographie analytique sur papier.

Plusieurs essais préliminaires ont été effectués pour la recherche de conditions optimales de séparation de peptides dans différents solvants.

La chromatographie est effectuée sur du papier Whatman n° 1 dans les solvants :

I. isopropanol-acide acétique-eau (75:10:15)

II. α picoline-NH₄OH concentrée-eau (70:2:28)

La révélation est faite à la ninhydrine Russel.

200 nmoles environ sont déposées en un point sur le chromatogramme. On laisse migrer dans le solvant I pendant 15 heures. Après séchage, la révélation met en évidence 5 taches principales : b, b₁, b₂, b₃, b₄ dont les plus importantes sont b₃ et b₄. Le chromatogramme ne révèle pas d'acides aminés libres. Un autre dépôt de 200 nanomoles de

peptides est soumis à une chromatographie bidimensionnelle d'abord dans le solvant I puis dans le solvant II. La révélation à la ninhydrine Russel laisse apparaître 10 taches principales de peptides.

B. Chromatographie préparative sur papier.

Elle est effectuée dans une première dimension dans le solvant I. 2 μ équivalents de peptides sont déposés en 13 points espacés de 0,5 cm. Des petites bandes repères sont révélées et les portions de chromatogramme correspondant aux différents peptides sont découpées et éluées à l'eau distillée entre deux lames de verre ; l'éluat est récupéré par centrifugation à faible vitesse. Après concentration à sec, le produit correspondant à chaque tache est dissous dans une petite quantité d'eau. Chaque peptide isolé est rechromatographié dans le solvant II. Le même processus permet d'isoler de nouveaux peptides dont la pureté est contrôlée par de nouvelles chromatographies sur papier.

C. Composition des peptides.

Une partie aliquote de chacun des peptides isolés après 2 chromatographies préparatives sur papier est hydrolysée par HCl 6 N à 110° pendant une nuit. Les hydrolysats sont étudiés par chromatographie sur couches minces de cellulose dans les solvants III : butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24) et IV : butanol-acide acétique-eau (5:1:2). Les résultats sont indiqués dans le tableau VI p. 58.

Certains acides aminés : Ala, Ser, Gly, Val sont présents dans la plupart des peptides, parfois à l'état de traces seulement. L'acide diaminopimélique ne se trouve que dans P₁₀. Les intensités des taches chromatographiques ne permettent pas en général de prévoir des rapports molaires simples entre les acides aminés. La pureté des peptides est à nouveau étudiée par chromatographie sur couches minces de cellulose dans les solvants III et IV. Les résultats sont schématisés dans les figures 19 a et b. La révélation à la ninhydrine fait apparaître pour la plupart des peptides plusieurs taches, cependant P₃, P₅ et P₆ sont pratiquement purs dans les deux solvants chromatographiques. Leur composition en acides aminés est la suivante :

P₃ : Glu, Thr, Val, Leu

P₅ : Ala, Glu, Ser, Gly, Val.

P₆ : Ala, Glu, Gly, Val, Leu.

Un essai de dansylation est effectué sur P₃, P₅ et P₆.

25 à 30 nmoles de chaque peptide sont traitées par le chlorure de dansyle puis les dansyls peptides sont hydrolysés par HCl 6 N à 105° pendant 16 heures. Les dérivés dansylés des acides aminés N-terminaux sont isolés par extractions à l'acétate d'éthyle. Ils sont identifiés par chromatographie sur gel de silice dans le solvant benzène-pyridine-acide acétique (80:20:2). La tache correspondant au dérivé dansylé de l'acide aminé N-terminal de chaque peptide est repérée par fluorescence sous

TABLEAU VI

Composition en acides aminés des différents peptides

Peptides	Ala	Glu	DAP	Asp	Thr	Ser	Gly	Val	Leu
P ₁				+			+	+	
P ₂	+	+			+	+		traces	traces
P ₃		+			+			+	+
P ₄				+		+	+	traces	traces
P ₅	+	+				+	+	+	
P ₆	+	+					+	+	+
P ₇	+					+	+	+	
P ₈	+			+			+	+	
P ₉				+	+	+		traces	
P ₁₀	+		+			traces		+	traces

ultra-violet en présence de dérivés dansylés d'acides aminés témoins. L'acide aminé N-terminal des peptides P_5 et P_6 est l'alanine. Cependant P_6 renferme également une certaine quantité de DNS-Val. P_6 est donc probablement un mélange de 2 peptides. Les résultats du peptide P_3 sont assez imprécis. La figure 20 montre la position de ces dérivés dansylés sur plaque de gel de silice.

Il est possible que P_5 comprenne la partie Ala-Glu du peptide appartenant au peptidoglycane, la liaison avec le reste de la fraction peptidique étant réalisée par le carboxyle α de l'acide glutamique.

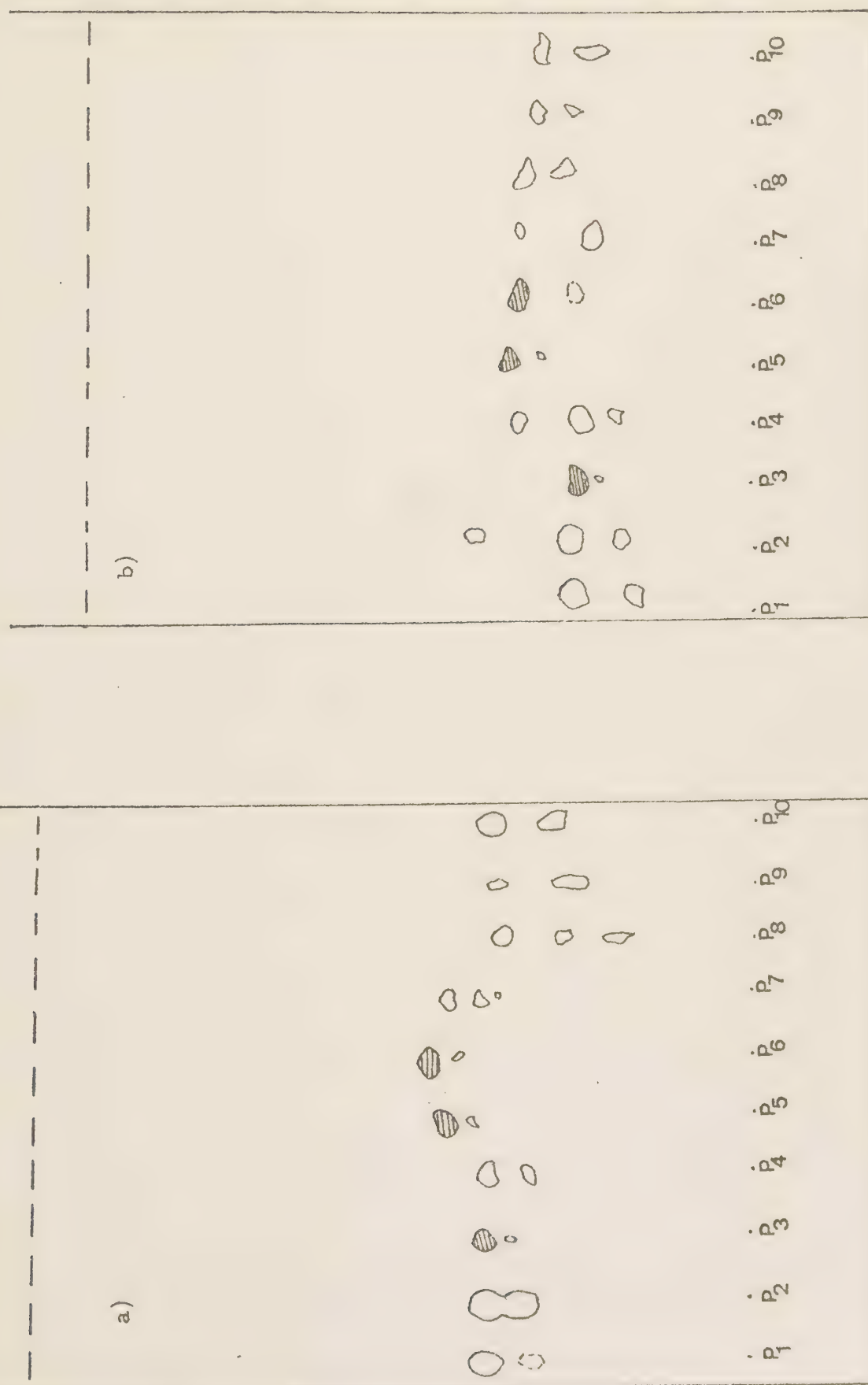


Figure 19. Etude de la pureté des peptides par chromatographie en couches minces de cellulose.

a) solvant butanol-pyridine-acide acétique-eau (30:20:6:24)

b) solvant butanol-acide acétique-eau (5:1:2)

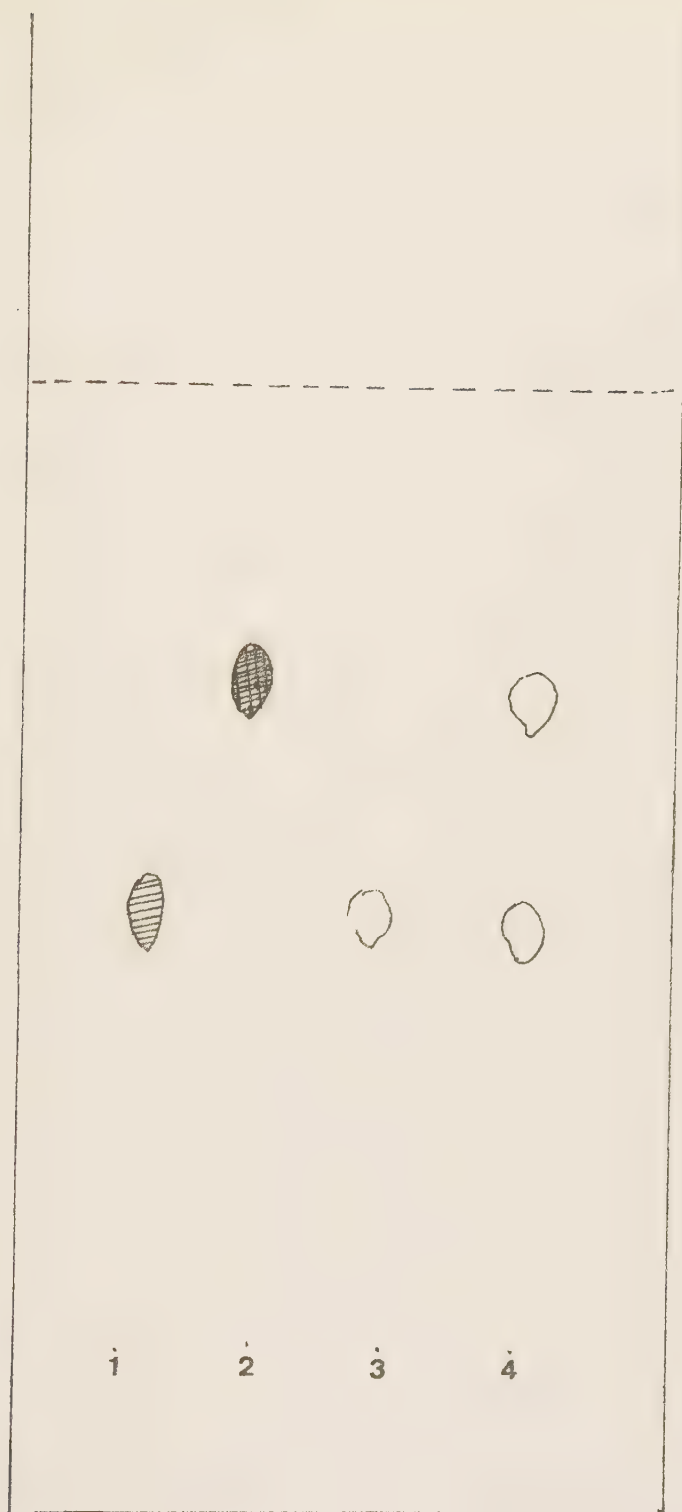


fig - 20 Chromatographie en couches minces
des dérivés dansylés des peptides P_5 et P_6

1. DNS-alanine témoin
2. DNS-valine témoin
3. Peptide P_5 après dansylation et hydrolyse
4. Peptide P_6 après dansylation et hydrolyse.

RESUME ET CONCLUSIONS

Après la préparation des parois purifiées par différents procédés de désintégration cellulaire, un examen comparatif de la composition en acides aminés de plusieurs espèces de *Nocardia* authentiques a montré dans toutes les souches étudiées la présence des acides aminés trouvés dans le peptidoglycane de *Nocardia kirovani* : alanine, acide glutamique, acide diaminopimélique. A côté de ces constituants du peptidoglycane, nous avons constaté la présence en quantité plus faible d'acides aminés non constitutifs du peptidoglycane dans toutes les souches étudiées. *Nocardia caviae* est la souche la plus riche en ces acides aminés.

Nous avons étudié le peptidoglycane isolé de la paroi de *Nocardia caviae*. Sa structure a été déterminée par l'isolement et l'identification des produits d'hydrolyse par des enzymes spécifiques. Nous avons isolé à l'état pur des unités disaccharidiques, des disaccharides peptides monomères, des bis-disaccharides peptides dimères (hepta et octapeptides), des tétrapeptides et des tripeptides diamidés et monoamidés.

-Le glycane des parois est constitué d'unités disaccharidiques d'acide N-acétylglucosaminyl β 1 $\rightarrow$ 4 N-glycolylmuramique. Cette structure est identique à celle du glycane de *Nocardia kirovani* (24) et des mycobactéries (10)(11).

- Une chaîne tétrapeptidique L-Ala- γ -D-Glu(NH₂)-mesoDAP(NH₂)-D-Ala diamidée sur l'acide glutamique et l'acide diaminopimélique est liée par une liaison amide au COOH de l'acide N-glycolylmuramique. Des tripeptides L-Ala- γ -D-Glu(NH₂)-mesoDAP(NH₂) diamidés sur l'acide glutamique et l'acide diaminopimélique et, en plus faible quantité, des tétrapeptides et tripeptides monoamidés sur l'acide diaminopimélique sont également liés à l'acide muramique de la chaîne polysaccharidique. La position du groupement amide sur l'acide diaminopimélique a été démontrée après dégradation d'Edman du peptide suivie de l'électrophorèse sur papier.

Ces unités peptidiques sont, au moins partiellement, reliées entre elles par des ponts interpeptidiques directs entre le groupement carboxyle de la D-alanine terminale et le groupement (L)NH₂ - de l'acide meso-diaminopimélique d'une chaîne peptidique voisine.

- L'action de l'enzyme AL 1 de *Myxobacter* est complètement négative sur le peptidoglycane après saponification ménagée, elle ne devient positive qu'après une hydrolyse acide douce qui sensibilise la paroi par élimination d'une fraction polysaccharidique formée de galactose et d'arabinose.

Cette observation est en accord avec l'existence de deux types de liaisons : liaisons esters phosphoriques et liaisons osidiques entre l'arabinogalactane et le peptidoglycane. Les premières liaisons sont coupées par saponification et les secondes par hydrolyse acide.

- L'isolement et l'identification d'acides nocardiques dans la paroi ainsi que d'arabinose et de galactose indiquent la présence d'esters nocardiques d'un arabinogalactane. Il faut signaler que l'isole-

ment de nocardates d'arabinose à partir des lipides liés de Nocardia brasiliensis (55) est en accord avec nos résultats. Un type de structure analogue a été proposé récemment par E.Lederer chez les mycobactéries (68).

- Nous avons pu constater par ailleurs la présence dans la paroi cellulaire d'acides aminés non constitutifs du peptidoglycane : Asp, Thr, Ser, Gly, Val, Leu et Phe. Ils ont déjà été signalés dans les parois de N.kirovani (24) et des mycobactéries (66) et observés par Beaman et coll. chez plusieurs espèces de Nocardia (61)(63). Ils sont particulièrement abondants dans la souche de Nocardia caviae que nous avons étudiée et ils constituent vraisemblablement une fraction polypeptidique de la paroi. Nous en avons fait une étude partielle. Cette fraction peptidique se retrouve dans les polymères après action du lysozyme. L'hydrolyse ménagée a donné un nombre élevé de peptides qui ont été purifiés et dont nous avons commencé l'étude. Les résultats concernant cette étude sont trop fragmentaires pour conduire à une structure mais l'existence d'un constituant polypeptidique des parois est certaine.

L'ensemble de nos résultats a permis de mettre en évidence les points suivants :

- L'acide N-glycolylmuramique et la séquence peptidique essentiellement diamidée sont des critères chimiotaxonomiques spécifiques des genres Nocardia et Mycobacterium (67)(69). Des souches voisines de Nocardia ne renferment pas d'acide N-glycolylmuramique et possèdent une séquence peptidique essentiellement monoamidée. La structure du peptidoglycane est donc caractéristique des Nocardia vrais et permet de les différencier des Streptomyces dont ils se rapprochent par d'autres aspects (69).

- Les parois des Nocardia renferment un peptidoglycane, des lipides, des lipopolysaccharides constitués d'esters nocardiques d'arabinogalactane mais aussi une fraction polypeptidique avec des acides aminés caractéristiques. Cette fraction est très vraisemblablement liée au peptidoglycane. La paroi des Nocardia apparait donc extrêmement complexe et des travaux ultérieurs seront nécessaires pour préciser les relations entre les différents constituants.

BIBLIOGRAPHIE

1. WEIDEL W., PELZER H., Adv. Enzymol., 26(1964)193.
2. HOARE D.S., WORK E., Biochem.J., 65(1957)441
3. WELSCH M., Comp. Biochem., 7(1964)252
4. TIPPER D.J., GHUYSEN J.M., STROMINGER J.L., Biochemistry, 4(1965)474
5. SALTON M.J.R., GHUYSEN J.M., Biochem.Biophys.Acta, 45(1960)355.
6. GHUYSEN J.M., Bacteriol.Rev., 32(1968)425
7. GHUYSEN J.M., STROMINGER J.L., Biochemistry, 2(1963)1110, 1119.
8. TIPPER D.J., STROMINGER J.L., Biochem.Biophys.Res.Comm., 22(1966)48.
9. LEYH-BOUILLE M., GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., STROMINGER J.L., Biochemistry, 5(1966)3079.
10. PETIT J.F., ADAM A., WIETZERBIN-FALSZPAN J., LEDERER E., Biochem.Biophys.Res.Comm., 35(1969)478.
11. ADAM A., PETIT J.F., WIETZERBIN-FALSZPAN J., SINAY P., THOMAS D.W., LEDERER E., FEBS Letters, 4(1969)87
12. MILLER I., PLAPP R., KANDLER O., Biochem.Biophys.Res.Comm., 25(1966)415.
13. GUINAND M., GHUYSEN J.M., SCHLEIFER K.H., KANDLER O., Biochemistry, 8(1969)200
14. SCHLEIFER K.H., PLAPP R., KANDLER O., Biochem.Biophys. Res.Comm., 26(1967)292
15. PERKINS H.R., Biochem.J., 102(1967)29C
16. SCHLEIFER K.H., PLAPP R., KANDLER O., Biochem.Biophys.Res. Commun., 28(1968)566

17. MUNOZ E., GHUYSEN J.M., LEYH-BOUILLE M., PETIT J.F.,
HEYMANN H., BRICAS E., LEFRANCIER P., *Biochemistry*,
5(1966)3748
18. TIPPER D.J., STROMINGER J.L., *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.*,
54(1965)1133
19. PERKINS H.R., *Biochem.J.*, 97(1965)3C
20. VAN HEIJENOORT J., ELBAZ L., DEZELEE P., PETIT J.F.,
BRICAS E., GHUYSEN J.M., *Biochemistry* 8(1969)207
21. CUMMINS C.S., HARRIS H., *J.Gen.Microbiol.*, 18(1958)173
22. CUMMINS C.S., *Ann.Inst.Pasteur*, 103(1962)385
23. GUINAND M., VACHERON M.J., MICHEL G., *FEBS Letters*,
6(1970)37.
24. VACHERON M.J., Thèse Doctorat-ès-Sciences physiques, Lyon 1971
25. TATSURA YAMAGUCHI, *J.Bacteriol.*, 89(1965)444
26. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and
Wilkins, Baltimore, 1948.
27. CUMMINS C.S., HARRIS H., *J.Gen.Microbiol.*, 14(1956)483.
28. ROMANO A.H., SOHLER A., *J.Bacteriol.*, 72(1956)865.
29. SAUTON B., *C.R.Acad.Sci.*, 155(1912)860.
30. SALTON M.R.J., HORNE R.W., *Biochim.Biophys.Acta*, 7(1955)177.
31. CONCHIE J., HAY A.J., STRACHAN I., LEVVY G.A., *Biochem.J.*,
115(1969)717.
32. PARCK J.T., HANCOCK R., *J.Gen.Microbiol.*, 22(1960)249.
33. BRAUN V., SIEGLIN U., *Eur.J.Biochem.*, 13(1970)336.
34. PARK J.T., JOHNSON M.J., *J.Biol.Chem.*, 181(1949)149.
35. TIPPER D.J., GHUYSEN J.M., STROMINGER J.L., *Biochemistry*,
4(1965)468.
36. STROMINGER J.L., PARK J.T., THOMPSON R.E., *J.Biol.Chem.*,
234(1959)3263.

37. GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., STROMINGER J.L., *Methods in Enzymology*, Acad.Press, New York, vol.VIII, 1966, 685.
38. GUINAND M., GHUYSEN J.M., SCHLEIFER K.H., KANDLER O., *Biochemistry*, 8(1969)200.
39. MOORE S., STEIN W.H., *J.Biol.Chem.*, 239(1964)PC2398.
40. GRAY W.R., SMITH J.F., *Anal.Chem.*, 33(1970)36.
41. DREZE A., BOECK A., *Arch.Intern.Physiol.*, 60(1952)201.
42. RUSSEL J., *J.Chromatog.*, 4(1960)251.
43. HAKOMORI S.I., *J.Biochem.*, 55(1964)205.
44. KANDLER O., *Ztbl.Bakt.I.Abt.Orig.*, 205(1967)197.
45. ENSIGN J.C., WOLFE R.S., *J.Bacteriol.*, 90(1965)395.
46. ENSIGN J.C., WOLFE R.S., *J.Bacteriol.*, 91(1966)524.
47. SHARON N., SEIFTER S., *J.Biol.Chem.*, 239(1964)PC2398.
48. KOCHETKOV N.K., CHIZHOV O.S., *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 21(1966)99.
49. ADAM A., PETIT J.F., WIETZERBIN-FALSZPAN J., SINAY P., THOMAS D.W., LEDERER E., *FEBS Letters*, 4(1969)87.
50. VILKAS E., MASSOT J.C., ZISSMANN E., *FEBS Letters*, 7(1970)77.
51. MOORE S., STEIN W.H., *J.Biol.Chem.*, 211(1954)893 et 907.
52. RHULAND L.E., WORK E., DENNAN R.F., HOARE D.S., *J.Amer.Chem.Soc.*, 77(1955)4844.
53. JUSIC D., ROY C., SCHOCHER A.J., WATSON R.W., *Can.J.Biochem. Physiol.*, 41(1963)817.
54. LATO M., BRUNELLI B., CIUFFINI G., MEZZETTI T., *J.Chromatog.*, 39(1969)407.
55. LANEELLE M.A., ASSELINEAU J., *FEBS Letters*, 7(1970)64.
56. SCHLENK H., GELLERMAN J.L., *Anal.Chem.*, 32(1960)1412.
57. MAURICE M.T., VACHERON M.J., MICHEL G., *Chem.Phys. Lipids*, 7(1971)9.

58. ACHARYA P.V.N., GOLDMAN D.S., J.Bacteriol., 102(1970)733.
59. SOHLER A., ROMANO A.H., NICKERSON W.J., J.Bacteriol., 75(1958)283
60. SNYDER M.L., SLAWSON M.S., BULLOCK W., PARKER R.B., J.Infec.Dis., 117(1967)332.
61. BEAMAN B.L., KIM K.S., BARKSDALE N.L., 71st Annual Meeting, Minneapolis 1971 G 49.
62. VACHERON M.J., GUINAND M., MICHEL G., GHUYSEN J.M., Eur.J.Biochem. sous presse.
63. BEAMAN B.L., KIM K.S., SALTON M.R.J., BARKSDALE L., J.Bacteriol., 108(1971)941.
64. FLECK J., MOCK M., C.R.Acad.Sci., Ser D, 272(1971)1560.
65. SCHLEIFER K.H., HUSS L., KANDLER O., Arch.Mikrobiol., 68(1969)387.
66. TAKEYA K., HISATSUNE K., INOUE Y., J.Bacteriol., 85(1963)24
67. AZUMA I., THOMAS D.W., ADAM A., GHUYSEN J.M., BONALY R., PETIT J.F., LEDERER E., Biochim.Biophys.Acta, 208(1970)444.
68. LEDERER E., Pure and Applied Chem., 25(1971)135.
69. BORDET C., KARAHJOLI M., GATEAU O., MICHEL G., J.Bacteriol. soumis pour publication.

TABLE DES MATIERES

	Page
Introduction	1
I. Travaux antérieurs	3
II. Position du problème	6
Chapitre I. Partie expérimentale	9
I. Cultures bactériennes	10
II. Techniques de préparation des parois	10
- 1° méthode	11
- 2° méthode	13
- 3° méthode	14
III. Techniques d'étude du peptidoglycane et de la partie peptidique	14
Techniques de dosage des glucides	14
A. Dosage du pouvoir réducteur	14
B. Microdosage des hexosamines	15
Techniques de dosage des acides aminés	15
A. Dosage par les DNP dérivés	15
B. Dosage global des groupements -NH ₂ terminaux	16
C. Dosage des acides aminés à l'autoanalyseur Technicon	16
D. Dégradation récurrente des peptides	17
Techniques chromatographiques	19
A. Chromatographie sur colonne de Sephadex	19
B. Chromatographie par échange d'ions	19
C. Chromatographie sur papier	20
D. Chromatographie sur couche mince	20
Electrophorèse	21
Techniques diverses	21
Perméthylation	21
Techniques hydrolytiques	22
Chapitre II. Etude du peptidoglycane	23
Etude des aminoacides des parois de différentes souches de Nocardia	24

Etude du peptidoglycane de <u>Nocardia caviae</u>	25
A. Action enzymatique de Myxobacter AL 1	25
B. Action enzymatique du lysozyme	28
C. Obtention du disaccharide	29
D. Etude du disaccharide	33
- identification par chromatographie	33
- étude par spectrométrie de masse	33
E. Etude du peptide monomère	36
- identification par chromatographie	
sur couche mince	37
- électrophorèse	37
- localisation de l'amide	39
- purification	40
F. Etude du bis-disaccharide peptide dimère	46
Expériences diverses	49
- identification et séparation du mesoDAP	49
- identification des sucres neutres dans	
les parois	51
- identification de l'acide nocardique dans	
les parois	51
Chapitre III. Etude de la partie peptidique du polymère	52
Isolement de peptides par hydrolyse ménagée du polymère	56
A. Chromatographie analytique sur papier	56
B. Chromatographie préparative sur papier	57
C. Composition des peptides	57
Résumé et conclusions	62
Bibliographie	65
Table des Matières	69

Vu.

Les membres du jury :

Chopin
Michel
A.M. Gounot

MM. J. CHOPIN
G. MICHEL
Mle A. M. GOUNOT

Vu et approuvé.

Le Directeur de l'U.E.R.
de CHIMIE - BIOCHIMIE

D. Gautheron
D. GAUTHERON

Vu et accordé le permis d'imprimer.

Lyon, le 3 juillet 1972

Le Président de l'Université
Claude Bernard,

J. Boidin
J. BOIDIN

